

**Cyanamidhydratase:
Isolierung, Charakterisierung
und immunreaktive cDNA Klone**

Brigitte M.M. Obermaier-Skrobranek

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0064

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Cyanamidhydratase :

Isolierung, Charakterisierung und immunreaktive cDNA Klone

von

Brigitte M. M. Obermaier-Skrobranek

aus

München

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von 12 (3) der Promotionsordnung vom 5. 3. 1981 von Prof. Dr. G. R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 19. 4. 1989

Brigitte Obermaier-Skrobranek

Die Arbeit wurde eingereicht am 19. 4. 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 6. 1989

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1985 bis März 1989 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Adelmann-Grill und Prof. Dr. K. Kühn, Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, für die große Unterstützung und Hilfe bei der Gewinnung der Antikörper

Für die kostenlose Überlassung von Cyanamid, Dicyanamid sowie die Züchtung von *M. verrucaria* im 200L Maßstab ebenso wie für das große entgegengebrachte Interesse und die Förderung meiner Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. Röck, Herrn Dr. Goll und Herrn Dr. Youngman, SKW Trostberg.

Für ihre Mitarbeit möchte ich mich auch bei den chem. techn. Assistentinnen Karin Merkl und Heidi Sieber bedanken. Birgit Greuling hat im Rahmen ihrer Ausbildung zur Laborantin ebenfalls zu dieser Arbeit beigetragen.

Zum Dank verpflichtet bin ich auch Christoph Wülfing, der im Rahmen seiner Diplomarbeit einen Beitrag beim Durchmustern der amplifizierten Genbank geleistet hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Pilzkolleginnen Ursula Maier und Lydia Estermaier für zahlreiche Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Peter Heinrich, Consortium für elektrochemische Industrie GmbH München, bedanke ich mich für dessen hilfreiche Ratschläge und Diskussionsbeiträge.

Allen Mitarbeitern meines Arbeitskreises danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

meinen Eltern

Alle so sehr beliebten und belobten Tugenden sind gehorsam gegen Gesetze, welche vom Menschen gegeben sind.

Einzig der Eigensinn ist es, der nicht nach diesen Gesetzen fragt. Wer eigensinnig ist, gehorcht einem anderen Gesetz, dem "Sinn" des Eigenen.

Hermann Hesse

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	1
Einleitung.....	2
Problemstellung.....	4
Material und Methoden.....	6
Material.....	6
Mikroorganismen.....	6
Bakterienstämme und Pilze.....	6
Nukleinsäuren.....	6
Plasmide und Phagen.....	6
Nukleotide.....	7
Medien.....	7
Enzyme.....	7
Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien.....	8
Geräte.....	10
Methoden.....	11
Züchtung von <i>Myrothecium verrucaria</i>	11
Dauerhaltung der adaptierten Kulturen.....	12
Großzucht.....	12
Spektralphotometrische Bestimmung von Dicyandiamid....	13
Definition der Aktivitätseinheit.....	13
Konzentrierung verdünnter Enzymlösungen.....	14
Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	14
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	14
Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.....	16
Isolierung des Antigens.....	16
Immunisierung.....	17

Isolierung von Serum.....	17
Ouchterlony-Test.....	18
ELISA-Test.....	20
Ausbluten der Kaninchen.....	24
Inhibierung dse ELISA-Tests.....	26
Immunelektrophorese.....	26
Reinigung des Serums durch Immunoabsorption.....	30
Kopplung des Antigens an CNBr-aktivierte Sepharose 4B30	
Chromatographie.....	31
Immunelektrophorese.....	34
Western-Blot.....	35
Immunpräzipitation.....	36
Arbeiten mit Bakterien und Phagen.....	38
Vermehrung auf Agarplatten.....	38
Aufbewahrung von Bakterienstämmen.....	38
Präparation von Bakterien zur Phageninfektion.....	38
Titerbestimmung.....	39
Isolierung einzelner Phagenplaques.....	39
Herstellung transformationskompetenter Zellen.....	39
Transformation der Bakterien.....	40
Lambda-gt11 Lysogene in <i>E. coli</i> Y1089.....	41
Schnellpräparation von Proteinlysaten der Lysogenen..	41
DNA-Isolierungen.....	41
Schnelle Isolierung von Lambda-DNA.....	41
Plasmid-Schnellpräparation.....	42
Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	43
Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen.....	43
Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäure-Lösungen...	44
Enzymatische Reaktionen an DNA.....	44
Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	44
Klonierung in Lambda-gt11 und <i>in vitro</i> Verpackung....	45
Ligation der cDNA in pUC-Vektoren.....	46

Hybridisierung.....	46
Transfer von RNA auf Nylonmembranen.....	46
Northernblot.....	47
Radioaktive Markierung von DNA-Proben.....	48
"Random primed" Methode.....	48
[³² P]- Markierung von Oligonukleotiden mit T4-	
Polynukleotidkinase.....	48
Immun-Screening.....	49
Autoradiographie.....	50
RNA-Isolierung.....	50
Pilzzucht für RNA.....	51
Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe der Detergens-	
Phenol-Methode.....	51
Extraktion mit heißem Phenol.....	53
Reinigung über Qiagen-Anionenaustauscher-Säule.....	53
Anreicherung von Poly(A)mRNA.....	54
CsCl-Gradientenzentrifugation.....	56
cDNA-Synthesen.....	57
Synthese nach Huynh <i>et al.</i> 1985.....	57
Synthese mit dem BRL-Synthesis-System.....	61
Synthese mit dem Pharmacia-Synthesis-Kit.....	62
Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	63
Agarose-Harnstoff-Gele für RNA.....	63
Agarose-Formaldehyd-Gel für RNA.....	64
Agarose-Gelelektrophorese für DNA.....	64
alkalische Gelelektrophorese.....	64
Polyacrylamid-Gelelektrophorese für DNA.....	65
Ergebnisse.....	66
Aktivitätstest für Cyanamidhydratase.....	66
Spektralphotometrische Bestimmung von Cyanamid.....	67
Enzymanreicherung.....	69
Rohextrakt.....	69
Ammoniumsulfatfraktionierung.....	69



Gelfiltrationen.....	71
Sephadex G-100.....	71
Superose™ 6 HR10/30 und Superose™ 12 HR10/30....	71
Anmerkungen.....	76
Rohextrakt.....	76
Ammoniumsulfatfraktionierung.....	76
Gelfiltrationen.....	77
Stabilität der Cyanamidhydratase.....	78
Hydrophobe Chromatographie.....	78
Charakterisierung der Cyanamidhydratase.....	81
Zeitabhängigkeit der Cyanamidhydratase-Aktivität.....	81
Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	82
Temperaturabhängigkeit.....	82
Einfluß der Pufferkonzentration.....	85
Dicyandiamid als Substrat.....	86
Aktivität in Gegenwart von Antikörpern.....	86
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	87
Identifizierung der Cyanamidhydratase im SDS-Gel.....	89
Bestimmung der relativen Molmasse.....	91
Induktion der Cyanamidhydratase <i>in vivo</i>	93
Immunreaktion unterschiedlicher Reinigungsstufen.....	96
RNA.....	97
RNA-Isolierung.....	97
Isolierung von Gesamt-RNA.....	98
Anreicherung von Poly(A)mRNA.....	100
Charakterisierung der Poly(A)mRNA.....	103
<i>in vitro</i> Translation und Immunpräzipitation.....	103
Hybridisierung von RNA/DNA Proben.....	105
cDNA Genbank von <i>M. verrucaria</i>	109
cDNA-Synthese.....	109
cDNA nach Huynh <i>et al.</i> 1985.....	111
cDNA nach Gubler und Hoffmann 1983.....	114
BRL cDNA-Synthesis-System.....	114
Pharmacia Synthesis-Kit.....	116

Test auf Klonierbarkeit der cDNA.....	119
Klonierung in Lambda gt11 und <i>in vitro</i> Verpackung...	120
Immunologisches Durchmustern der Genbank.....	125
Ermittlung der geeigneten Antikörper-Verdünnung....	125
Immunscreening.....	127
Charakterisierung der Klone.....	133
EcoRI Hydrolyse.....	133
Expression klonierter cDNA ala Fusionsprotein....	133
Diskussion.....	137
Literatur.....	146
Lebenslauf.....	157
Abkürzungsverzeichnis.....	158

Verzeichnis der Figuren und Tabellen

Fig. 1: Immunopräzipitat nach Ouchterlony-Test, schematisch dargestellt für das Serum von Kaninchen 1.....	19
Fig. 2: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei geringer Verdünnung....	22
Fig. 3: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei hoher Verdünnung.....	23
Fig. 4: ELISA-Test der Kaninchensera nach dem Ausbluten....	25
Fig. 5: Inhibierung des ELISA-Tests.....	27
Fig. 6: Immunpräzipitat nach der Immunelektrophorese, schematisch dargestellt.....	28
Fig. 7: Elutionsprofil der Immunoaffinitätschromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose 4B.....	32
Fig. 8: ELISA-Test von Serum vor und nach der Immunoaffinitätschromatographie.....	33
Fig. 9: Immunpräzipitat nach der Immunelektrophorese, schematisch dargestellt für das Serum von Kaninchen 2.....	34
Fig. 10: Elutionsprofil der Cyanamidhydratase bei der Gelfiltration an Sephadex G-100 (95x3 cm).....	72
Fig. 11: Elutionsprofil der Gelfiltration an Superose™ 6 HR10/30.....	73
Fig. 12: Elutionsprofil der Gelfiltration an Superose™ 12HR10/30.....	74
Fig. 13: Elutionsprofil der hydrophoben Chromatographie an der Ultropac TSK Phenyl 5PW Säule.....	79
Fig. 14: Zeitabhängigkeit der Cyanamidhydrataseaktivität....	81
Fig. 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratsättigung.....	83
Fig. 16: Substratabhängigkeit der Cyanamidhydratisierungsgeschwindigkeit in der Darstellung nach Lineweaver und Burk (1952).....	83
Fig. 17: Temperaturabhängigkeit der Cyanamidhydratase.....	84
Fig. 18: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der einzelnen Schritte der Enzymanreicherung.....	88

Fig. 19: Schematische Darstellung eines gelelektrophoretischen Analogons einer hoch angereicherten Cyanamidhydratasepräparation (Superose-Fraktion), aufgetrennt auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel (60 V, 16h)	90
Fig. 20: Bestimmung der relativen Molmasse durch Gelelektrophorese unter dissoziierenden Bedingungen...	92
Fig. 21: Gelelektrophoretische Analyse der aktivsten Fraktionen einer Gelfiltration an Sephadex G-100 nach 1 Woche Lagerzeit.....	92
Fig. 22: Densitometrische Auswertung eines Western Blots unter Verwendung der durch Immunoaffinitätschromatographie gereinigten Antikörper.....	94
Fig. 23: Gelelektrophoretische Analyse der RNA-Präparation..	99
Fig. 24: Gelelektrophoretische Analyse von Poly(A)mRNA.....	101
Fig. 25: <i>In vitro</i> Translation der Poly(A)mRNA aus <i>M. verrucaria</i>	104
Fig. 26: Immunpräzipitation des Translationsansatzes.....	106
Fig. 27: Dot-Blot Hybridisierung.....	107
Fig. 28: Northern-Blot.....	108
Fig. 29: Verschiedene Wege zur cDNA-Synthese.....	110
Fig. 30: Größenverteilung der cDNA Synthese nach Huynh <i>et al.</i> (1985).....	112
Fig. 31: cDNA Größenverteilung nach der Synthese mit dem BRL cDNA Synthesis System.....	115
Fig. 32: Größenverteilung der cDNA nach der Synthese mit dem Pharmacia cDNA Synthesis Kit.....	118
Fig. 33: <i>Eco</i> RI Hydrolyse von mit cDNA rekombinierter pUC13 DNA.....	121
Fig. 34: Genkarte von Lambda-gt11 (nach Snyder <i>et al.</i> 1987).....	122
Fig. 35: <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I Hydrolyse mit cDNA rekombinierter Lambda-gt11 DNA.....	124
Fig. 36: Immunodot.....	126

Fig. 37: Durchmustern der Genbank mit unterschiedlichen IPTG-Induktionszeiten, Detektion mit [125 J]Protein A.....	130
Fig. 38: Anreicherung eines beim ersten Durchmustern immunpositiven Signals.....	131
Fig. 39: Immundetektion über Farbreaktion	132
Fig. 40: <i>Eco</i> RI Hydrolyse von DNA aus immunpositiven Lambda-gt11 Klonen.....	134
Fig. 41: Expression von β -Galactosidase Fusionsproteinen...	136
Tab. 1: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Mangan-konzentration.....	68
Tab. 2: Fraktionierung mit Ammoniumsulfat.....	70
Tab. 3: Cyanamidhydratase-Anreicherung.....	75
Tab. 4: Hydrophobe Chromatographie.....	80
Tab. 5: Einfluß verschiedener Puffer auf die Enzymaktivität.	85
Tab. 6: Hemmung der Enzymaktivität durch Cyanamidhydratase spezifische Antikörper.....	87
Tab. 7: Aktivitätstest der aus dem SDS-Polyacrylamidgel eluierten Zonen.....	90

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Bodenpilz *Myrothecium verrucaria* konnte das Enzym Cyanamidhydratase durch Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltrationen an Sephadex G-100 sowie Superose 6 bzw. 12 HR10/30 isoliert werden. Das Enzym wird durch sein Substrat Cyanamid induziert, das Dimere Dicyandiamid wird nicht umgesetzt.

Der optimale Wirkungsbereich des Enzyms liegt bei 50-55°C. Die Aktivität der Cyanamidhydratase wird durch Mangan und durch Zusatz von Salzen (KCl, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gehemmt. Die Michaelis-Menten-Konstante konnte mit 27 mM bestimmt werden. Die relative Molmasse der Cyanamidhydratase im denaturierten Zustand beträgt 28840 ± 1000 .

Gegen dieses 28 KD Protein wurden durch Immunisierung von Kaninchen Antikörper gewonnen, deren Cyanamidhydratase-Spezifität belegt werden konnte.

Aus der isolierten Gesamt-RNA des Bodenpilzes wurde Poly(A)mRNA angereichert, die nach immunologischer Charakterisierung zu cDNA transkribiert wurde.

Die Klonierung der cDNA erfolgte in dem Expressionsvektor Lambda-gt11. Nach der *in vitro* Verpackung wurde eine repräsentative Genbank erhalten.

Mit Hilfe der gewonnenen Antikörper wurden beim Durchmustern dieser Genbank immunreaktive Klone angereichert.

EINLEITUNG

Der in der Landwirtschaft in großem Maßstab als Düngemittel eingesetzte Kalkstickstoff besteht im wesentlichen aus Calcium-Cyanamid oder dem Reinstoff Cyanamid. Da Cyanamid auf die meisten Pflanzen als Kontaktherbizid wirkt (Bauer 1965, SKW Trostberg 1981), muß es vor der Keimung eingesetzt werden. Eine Gewinnung von Kulturpflanzen, die resistent gegenüber der Herbizidwirkung von Cyanamid sind, wäre daher für die Landwirtschaft von großem Vorteil .

Als Ursache für Herbizidresistenz kann man im wesentlichen vier Mechanismen unterscheiden:

1. Eine Überproduktion desjenigen Pflanzenbestandteils, der als Ziel für das Herbizid dient, sollte zum allmählichen Abfangen des Wirkstoffes und damit einer Inaktivierung führen ohne daß seine biologische Funktion verloren geht.
2. Als weitere Möglichkeit ist eine Strukturveränderung des Herbizidakzeptors anzusehen. So hat z. B. eine Mutation im *psbA* Gen aus *Amaranthus hybridus*, welches für das Chinon-bindende Membranprotein QB kodiert, eine Resistenz gegen das Herbizid Atrazin zur Folge (Cheung et al. 1988).
3. Auch gelang die Erzeugung Phosphinotricin- resistenter transgener Pflanzen durch Transformation mit dem *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* unter Zuhilfenahme des *Agrobacterium*-Systems (DeBlock et al. 1987). Das *bar* Gen kodiert für eine 22 kD Acetyltransferase, die eine relativ hohe Spezifität für Phosphinotricin zeigt (Thompson et al. 1987) und damit in der Lage ist, dieses Herbizid zu inaktivieren.

4. Der beste Weg zur Resistenzerzeugung bei Kulturpflanzen ist allerdings die Suche nach einem Genprodukt, welches das Herbizid zu nutzbaren Metaboliten abbaut. Bevorzugt ist hier natürlich eine Degradation zu Nährstoffen. Als Beispiel ist das *bxn* Gen aus dem Bodenbakterium *Klebsiella ozaenae* anzuführen, welches für eine Nitrilase kodiert (Stalker et al. 1988). Da verschiedene Untersuchungen mit Herbiziden, die CN-Gruppen besitzen, ergaben, daß für die Toxizität dieser Verbindungen ausschließlich die CN-Gruppe verantwortlich ist (Buckland 1973, Collins 1973, Smith und Cullimore 1974), ist eine Hydrolyse dieser funktionellen Gruppe durch Nitrilasen und eine anschließende Freisetzung von Ammoniak oder Harnstoff ein sehr guter Weg zur Inaktivierung bei gleichzeitiger partieller Verwertung der entstandenen Produkte als Nährstoff. Die Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae* ist in der Lage, das Herbizid Bromoxynil zu hydrolysieren und verleiht Pflanzen, die mit dem für sie kodierenden Gen transformiert waren, Herbizidresistenz.

Auch die CN-Verbindung Cyanamid muß, um als Stickstoffdünger wirken zu können, im Boden zuerst in ein Ammoniumsalz oder Nitrat überführt werden. Die Hauptreaktionsfolge führt nach Rathsack (1955) von Calcium-Cyanamid über Harnstoff zu Ammoniak. Ernst (1967) konnte eine Beteiligung anorganischer Katalysatoren an dieser Reaktion zuverlässig ausschließen. Er erkannte im Boden vorhandene Mikroorganismen als allein verantwortlich für die Umsetzung von Cyanamid. Stransky und Amberger (1973) konnten aus dem Bodenzpilz *Myrothecium verrucaria* ein für diese Reaktion relevantes Enzym, die Cyanamidhydratase (E.C.4.2.1.69), isolieren und grob charakterisieren. Nach ihren Untersuchungen findet ein 1:1 Umsatz von Cyanamid zu Harnstoff, katalysiert durch dieses Enzym, statt.



Dieser Stoffwechselweg führt im Zusammenwirken mit der in Mikroorganismen und Pflanzen ubiquitär vorkommenden Urease zum Abbau des Cyanamids zu den biologisch völlig unbedenklichen Produkten CO_2 und NH_4^+ . Die Cyanamidhydratase katalysiert damit eine ähnliche Reaktion wie die Cyanase aus *E.coli* (Anderson 1980) oder die Nitrilhydratase aus *Brevibacterium* R312 (Nagasawa et al. 1986). Über den Reaktionsmechanismus der Cyanamidhydratase ist bisher nichts bekannt.

Problemstellung

Das von Stransky und Amberger (1973) aus dem Cellulose-abbauenden Bodenpilz *M. verrucaria* isolierte Enzym Cyanamidhydratase (E.C.4.2.1.69) sollte von mir hoch gereinigt und charakterisiert werden.

Das gereinigte Enzym sollte dann zur Produktion von für Cyanamidhydratase spezifischem Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen dienen.

Zur Isolierung des Gens für dieses Enzym standen zwei Wege zur Wahl:

1. Die Klonierung von fragmentierter genomischer DNA in geeignete Vektoren (Cosmide, Lambda-Vektoren) mit dem Nachteil, auch evtl. nichtkodierende Intronbereiche zu erfassen.
2. Die Klonierung über cDNA, welche eine direkte Abschrift der Poly(A)mRNA darstellt und somit einen direkten Zugang zum Gen bietet.

Da für diese Arbeit Weg 2 gewählt wurde, war es nötig, zuerst aus dem *M. verrucaria* RNA-Pool die Poly(A)mRNA anzureichern und zu charakterisieren.

Anschließend sollte sie in cDNA transkribiert und in Expressionsvektoren einkloniert werden, die ein Absuchen der cDNA-Genbank mit dem gewonnenen Cyanamidhydratase-spezifischen Antiserum erlauben.

MATERIAL

Mikroorganismen

Bakterienstämme

Aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Prof. Hartmann wurde der Stamm *E. coli* JM83 (Vieira und Messing 1982) verwendet. Die Stämme *E. coli* Y1089 (r⁻) und *E. coli* Y1090 (r⁻) (Young und Davis 1983) wurden von Promega (bezogen über Atlanta, Heidelberg) bezogen.

Pilze

Eine Stammkultur von *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) [Ditmar exFr, 62765 --Gerlach IMB G84--Domsch.Soil, Germany] wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen erhalten.

Nukleinsäuren

Plasmide

Das Plasmid pUC13-*Eco*RI/BAP (Vieira und Messing 1982) wurde von Pharmacia, Freiburg bezogen.

Phagen

Lambda-gt11/*Eco*RI hydrolysierte Phagen-DNA wurde von Promega (über Atlanta, Heidelberg) bezogen.

Nukleotide

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

[γ - 32 P]ATP (5000 Ci/mMol)

[α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mMol)

[35 S]-Methionin (800 Ci/mMol)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
ATP

Medien

L-Broth-Medium (LB): 5g Hefeextrakt
10g Bactotrypton
5g NaCl H₂O ad 1L

TYM-Medium: 20g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
5.84g NaCl
2.46g MgSO₄ H₂O ad 1L

Enzyme

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Pharmacia, Freiburg; New England Biolabs, Schwalbach.

Weitere Enzyme

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:
AMV reverse Transkriptase, Desoxyribonuklease I, Klenow DNA Polymerase I, Ribonuklease A, ϕ 1-Nuklease, T4 DNA-Ligase, T4 Polynukleotidkinase

Pharmacia, Freiburg:

T4 DNA-Ligase, T4 Polynukleotidkinase

New England Biolabs, Schwalbach:

EcoRI Methylase

Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien

Alle Standardchemikalien und Salze wurden in p.a. Form verwendet.

Insbesondere wurden eingesetzt:

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

Hybond C Membran, [125 J]-ProteinA, Reticulozyten Lysat N90

Behringwerke AG, Marburg:

Komplettes Freund'sches Adjuvans, Anti-Kaninchen-Antikörper
Peroxidase gekoppelt

Bender und Hobein, München:

Whatman 3MM Papier, Whatman GF/C Filter 2.5 cm

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg:

BRL cDNA Synthesis System

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Dithiothreitol (DTT), Isopropyl- β -D-thio-galactosepyranosid (IPTG), Oligo(dT)-Cellulose, 5 Puffer System für Restriktionsenzyme, Random Primed DNA Labeling Kit, Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V

Difco Laboratories , Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast-Extrakt
(bezogen über Otto Nordwald KG, Hamburg)

Merck AG, Darmstadt:

Amidoschwarz 10B, Bromphenolblau, Diacetyl, Formaldehyd, Formamid, 1-Naphtol, Natriumdesoxycholat, Polyethylenglycol (6000), Xylencyanol

Pharmacia, Freiburg:

Sephadex G-100, CNBr aktivierte Sepharose 4B, Superose™ 6 HR10/30, Superose™ 12 HR10/30, cDNA Synthesis Kit

Photo Schaja, München:

Polaroid Film 107, Kodak Röntgenfilm X-Omat AR, Fudji Röntgenfilme RX-100

Promega, Wisconsin, USA:

(bezogen über Atlanta, Heidelberg)

E. coli Lysat, Lambda Sorb Phage Adsorbent, Protoblot Lambda-gt11 Immunscreening System, Protoclone Lambda-gt11 System, RNasin

Sartorius GmbH, Göttingen:

Minisart NML 0.45 µm, 0.2 µm Sterilfilter

Serva, Heidelberg:

Coomassie Brilliant Blue G250, Diethylbarbitursäure, Spermidin, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Schleicher und Schüll, Dassel:

DEAE-Cellulosemembran NA-45, Nitrocellulosefilter BA-85

Sigma Chemie, München:

Ampicillin, 5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactosid (X-gal), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethidiumbromid, Kanamycin, Molekulargewichtsmarker SDS-Blue, Nonidet P-40, Penicillin, Pentacyanoamin-Ferroat P-7266

SKW, Trostberg:

Cyanamid F-1000, Dicyandiamid

Töpfer GmbH, Dietmannsried:

Naturaflor (Magermilchpulver)

Geräte

Außer Standardlaborgeräten wurden verwendet:

Atlanta GmbH, Heidelberg:

Blotting Apparatur (Transphor TE 42)

Branson Sonic Power Company, Schwäbisch Gmünd:

Sonifier B12

Hirschmann, München:

elscript 400 Densitometer

Pharmacia LKB, Freiburg:

LKB HPLC Anlage: Controller 2152, Pumpe 2150, Uvicord SD
2156

METHODEN

Züchtung von *Myrothecium verrucaria*

Das auf Kartoffelagar (s. Material) gezogene Pilzmycel wurde in Flüssigkultur weiter vermehrt.

Zusammensetzung des Mediums für 1 L Lösung nach Stransky und Amberger (1973).

1/15 M Soerensenpuffer (Rauen 1956) pH 6.7:

10.26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$
 5.19 g KH_2PO_4
 5.00 g Natriumacetat
 300 mg MgSO_4
 30 mg CaCl_2

Spurenelemente (10 mg/mL Stammlösung):

10 μL ZnCl_2
 10 μL $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 5 μL $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 5 μL $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
 5 μL $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$
 1 μL $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
 30 μL H_3BO_3

Die Salze wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst und autoklaviert. Als Stickstoffquelle diente zunächst KNO_3 (0.2 M), das in wenig Medium gelöst steril zufiltriert wurde (Millipore Sterilfilter 0.2 μm). Während der 2-3 wöchigen Adaptionsphase (Inkubation bei 25°C, 50 Upm, im Dunkeln) wurde das Pilzmycel 2x wöchentlich auf frisches Medium überimpft. Anschließend konnte das KNO_3 durch Cyanamid (0.2 M) als alleiniger Stickstoffquelle ersetzt werden. Ein 8faches Passagieren der Pilzkultur (alle 3-4 Tage) gewährleistete die vollständige Anpassung der Pilze an die neue Stickstoffquelle Cyanamid und erlaubte eine Anzucht in größerem Maßstab.

Dauerhaltung der adaptierten Kulturen

Da sich die an Cyanamid adaptierten Pilze nicht auf Agarplatten des entsprechenden Cyanamid-haltigen Mediums vermehren und lagern ließen, mußte ständig eine 50 mL Flüssigkultur unterhalten werden, welche 1-2x pro Woche passagiert wurde. Parallel dazu wurden auf KNO₃ adaptierte Pilze in gleicher Weise weitergezogen. Zur Unterdrückung bakterieller Infektionen wurde bei diesen Kulturen dem Medium ein Antibiotikagemisch von Penicillin und Kanamycin (je 50µg/mL) zugesetzt. Der Erfolg dieser Maßnahme konnte durch Ausplattieren von Medienproben auf LB-Agarplatten (Maniatis et al. 1982) kontrolliert werden. Es sollte keinerlei Bakterienwachstum bei Inkubation dieser Platten über Nacht (37°C) auftreten.

Großzucht

Die für diese Arbeit benötigten großen Mengen an Pilzmycel wurden durch Zucht in 40 L Ansätzen gewonnen. Nach Sterilisation mit 120°C heißem Wasserdampf wurden die für die Zucht eingesetzten 50 L Behälter mit 40 L sterilem Medium befüllt. Die benötigte Menge Cyanamid konnte nach Lösen in 200 mL Medium direkt steril zufiltriert werden. Der so vorbereitete Ansatz wurde nach Animpfen mit 2 L Pilzkulturen (6-8 Tage dicht angewachsen) durch Einleitung steriler Luft (alle Leitungen UV-sterilisiert) mit dem für das Wachstum nötigen Sauerstoff versorgt und gleichzeitig durchmischt. Nach 8-10 tägiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte kaum noch Cyanamid im Medium nachgewiesen werden. Das Pilzmycel wurde durch ein dichtmaschiges, steriles Nylonnetz abfiltriert, vorsichtig ausgepresst und sofort bei -70°C tiefgefroren. Die für einen solchen Ansatz typische Ausbeute betrug etwa 250-300 g Mycel (Naßgewicht). Eine Kontamination mit Bakterien hat eine Reduktion der Ausbeute auf fast Null zur Folge. Sie macht sich unter anderem durch starke Schaumentwicklung und Grünfärbung des

Mediums bemerkbar. Die Bakterien allein sind nicht in der Lage auf Cyanamidhaltigem Medium zu wachsen.

Spektralphotometrische Bestimmung von Dicyandiamid

Die kolorimetrische Bestimmung von Dicyandiamid erfolgte nach Vilsmeier (1982) bei Raumtemperatur.

Dazu wurden eingesetzt: 1.8 mL H₂O
 1.0 mL wässrige Naphtol-Lösung
 0.5 mL wässrige Diacetyl-Lösung
 (0.005 M)
 20 µL Probelösung bzw. 10 mM Tris-
 HCl pH 8.0

wässrige Naphtol-Lösung : 1.8 M NaOH
 1.2 M Na₂CO₃
 0.34 M C₂H₅OH
 0.03 M EDTA
 0.08 M 1-Naphtol

Die Extinktion des gebildeten roten Farbkomplexes wurde nach 60 min bei 540 nm gemessen. Zur Berechnung des Gehalts an Dicyandiamid wurde eine Eichkurve mit 1-27 µg Dicyandiamid erstellt.

Definition der Aktivitätseinheit

Die Enzymaktivität wird in der Einheit Katal (kat) gemessen (Bergmeyer 1983). Ein µkat ist die Enzymaktivität, welche in einer Sekunde 1 µMol Cyanamid umsetzt.

Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen

(Bensadoun und Weinstein 1976)

Die Enzymlösung wurde mit H_2O auf 600 μL aufgefüllt und mit 10 μL 1%iger Natriumdesoxycholatlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Protein durch Zugabe von 200 μL 24% Trichloressigsäure gefällt und zentrifugiert (12000 Upm, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 30-50 μL 10 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen und mit 2n NaOH neutralisiert.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur qualitativen Bestimmung während der Anreicherung der Cyanamidhydratase wurde die Elution von Proteinen von den verwendeten Säulen durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm verfolgt.

Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (1951) sowie der Methode nach Warburg (1941), die beide bei Jaenicke (1966) genau beschrieben sind.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(In Anlehnung an Lämmli 1970)

Unter denaturierenden Bedingungen erfolgte die Auftrennung der Proteine auf einem vertikalen 10%igen bzw. 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel folgender Zusammensetzung:

	Trenngel-Lösung	Sammelgel-Lösung
30% Acrylamid	10 mL bzw 15 mL	1.7 mL
2% Bisacrylamid	1.3 mL	0.7 mL
1M Tris-HCl pH 8.7	11.2 mL	25 mL pH 6.9
10% SDS	0.3 mL	0.1 mL
H_2O	7.2 mL bzw 2.2 mL	6.3 mL
TEMED	25 μL	25 μL
10% Per	100 μL	50 μL

Die Gele wurden zwischen 15 cm x 13.5 cm großen Glasplatten (Abstand 1.6 mm) polymerisiert.

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 30 µL SDS haltigem Gelauftragungspuffer versetzt und durch Erhitzen (3 min) in kochendem Wasser denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte meist über Nacht (50-70 V), bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt und im Gelrockner entwässert (ca.45 min) oder nach Fixierung in 25% i-Propanol, 10% Eisessig getrocknet und autoradiographiert oder die Proteinbanden auf Nitrocellulose übertragen (s. Westernblot).

Gelauftragungspuffer: 0.65 mL 1 M Tris-HCl pH 6.8
 3.0 mL 10% SDS
 1.0 mL Glycerin
 1.0 mL 0.1% Bromphenolblau
 ad 10 mL mit H₂O auffüllen und vor
 Gebrauch pro mL Puffer 50 µL Mercapto-
 ethanol zugeben.

Elektrophoresepuffer: 3.0 g Tris
 14.4 g Glycin
 10.0 mL 10% SDS
 ad 1 L mit H₂O auffüllen.

Coomassie-Färbung
 (Weber und Osborn 1969)

0.25% Coomassie Brillant G-250 in Methanol : Eisessig : H₂O
 = 5 : 1 : 5

Entfärben: 7.5% Essigsäure, 5% Methanol

Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Die Immunisierung der Kaninchen sowie die Tests auf eine erfolgreiche Immunantwort und die Aufreinigung des Serums wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Adelman-Grill (Arbeitsgruppe Prof. Kühn) im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Isolierung des Antigens

Die der Cyanamidhydrataseuntereinheit entsprechende Bande sollte sich aus einem denaturierenden Polyacrylamidgel gut isolieren lassen. Zusätzlich würde Polyacrylamid als Carrier wirken und somit zu einer Steigerung der Immunantwort führen (Adelman-Grill, pers. Mitteilung).

Die vereinigten aktivsten Fraktionen der 6-8 Gelchromatographien an Superose™ 6 bzw. Superose™ 12 pro Enzymanreicherung (s. Ergebnisse) wurden durch eine Ammoniumsulfatfällung bis 65% Sättigung konzentriert und das erhaltene Präzipitat in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen (700-900 µL). Je 40 µL Proteinlösung wurde mit 30 µL Gelauftragspuffer hitzedenaturiert und über Nacht (60 V) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (2-3 Gele) aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wurde eine Spur der Probe sowie eine Spur mit Markerproteinen mit einem Skalpell abgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt, während das restliche Gel feucht gehalten wurde. Mit Hilfe dieser gefärbten Spuren konnte die der Cyanamidhydratase entsprechende Bande durch genaues Ausmessen (Säurekontraktion wurde berücksichtigt) aus den ungefärbten Gelspuren mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Die Gelstückchen wurden in ein Glasgefäß gegeben, mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 versetzt und mit einem dazu passenden Plümmer fein zermahlen, bis eine dickliche, zähe Suspension entstanden war. Diese Suspension wurde zur Immunisierung

eingesetzt. Zwischen 300-450 µg Antigen konnten auf diese Art gewonnen werden.

Immunisierung

(in Anlehnung an Hurn und Chantler 1980)

Um die humorale Immunantwort zu stimulieren, wurde die zähe Suspension mit gleicher Menge an komplettem Freund'schen Adjuvans (3.5-4.5 mL) versetzt und durch Hin- und Herdrücken zwischen zwei total aus Glas bestehenden Spritzen (Kopplungsadapter und Spritzen wurden vom Max-Planck-Institut zur Verfügung gestellt) zu einer stabilen schaumigen Wasser-in-Öl Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde drei Kaninchen (je 2-3 mL) in 6-8 Portionen subkutan injiziert. Die Anlage solcher Immunogendepots unter der Haut führt zu einer langsamen Abgabe des Antigens an die Lymphflüssigkeit und schließt eine mögliche toxische Wirkung zuverlässig aus. Der gesamte Vorgang wurde im Abstand von 4 Wochen 2x wiederholt. Nach weiteren 2 Wochen wurden 3.5 mL des reinen Immunogens ohne Adjuvans als "booster" auf zwei Kaninchen verteilt (ein Kaninchen war verstorben), um Antisera mit möglichst hohem Titer zu erhalten. Beide Kaninchen wiesen unter der Haut liegende kleine Kapseln an den Stellen, an denen die Injektionen stattfanden, auf. Dies deutete auf eine erfolgreiche Immunisierung hin.

Isolierung von Serum

Aus der Ohrvene wurden jedem Kaninchen ca. 2 mL Blut entnommen. Diese Blutproben wurden zur Koagulation 1h bei 37°C gehalten und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Durch Zentrifugation (15 min, 3000 Upm, Labofuge 2) konnten die Blutkörperchen abgetrennt werden, worauf eine Untersuchung

des so erhaltenen Serums auf spezifische Antikörper möglich war.

Ouchterlony-Test

In diesem Test nach Ouchterlony (1958) wird bei einer erfolgreichen Immunisierung durch Diffusion von Antigen und Antikörper zueinander im Bereich äquivalenter Konzentrationen ein Präzipitat gebildet.

Dazu wurden 0.5 g Agarose in 50 mL 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 durch Erhitzen gelöst und mit 0.5 mL 2% NaN_3 in H_2O versetzt. Ein dafür geeigneter Rahmen wurde mit 2x3 gutgereinigten Objektträgern ausgelegt und mit der gelösten Agarose ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden die in Fig. 1 dargestellten Lochmuster je dreimal eingestantzt (LKB Lochstanzer).

Je 12 μL folgender Lösungen wurden einpipettiert:

- 1: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 (5 mg/mL)
- 2: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 1:10 verdünnt (0.5 mg/mL)
- 3: Gelfiltrat nach Superose™ 6 HR10/30 (1.1 mg/mL)
- 4: Antiserum von Kaninchen 1 bzw. 2

Nach Diffusion über Nacht bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer wurde für 3x15 min mit PBS-Puffer gewaschen. Durch anschließende Färbung mit Amidoschwarz konnten die Präzipitate als scharfe Ringbildung sichtbar gemacht werden (Fig.1). Bei beiden Kaninchen war die Immunisierung somit erfolgreich. Die Bildung jeweils eines Rings läßt auf eine Spezies von Antikörpern schließen, ein leichtes Verschmieren des Rings deutet auf eine Denaturierung der zum Test eingesetzten Proteine hin (Adelmann-Grill, pers. Mitteilung).

Färbelösung: 0.6% Amidoschwarz 10B in

Methanol:Eisessig:Wasser = 45:10:45

PBS-Puffer: 10 mM Phosphat, 10 mM NaCl, 0.02% NaN_3 , pH 7.4

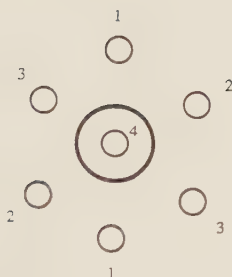


Fig. 1: Immunopräzipitat nach Ouchterlony-Test, schematisch dargestellt für das Serum von Kaninchen 1

Die Durchführung ist im Text genau beschrieben.

- 1: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 (5 mg/mL, 12 μ L)
- 2: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 (0.5 mg/mL, 12 μ L)
- 3: Gelfiltrat nach Superose™ 6 HR10/30 (1.1 mg/mL, 12 μ L)
- 4: Antiserum von Kaninchen 1 (12 μ L)

ELISA-Test

(In Anlehnung an Engvall 1980)

Die Spezifität von Antisera läßt sich in einem ELISA-Test (enzyme-linked-immunosorbent-assay) untersuchen (Engvall *et al.* 1980). Dabei werden die Vertiefungen in Mikrotiterplatten mit Antigen beschichtet und dessen Fähigkeit, Immunglobuline zu binden, über eine Farbreaktion bestimmt. In 4 Reihen à 12 Vertiefungen wurden je 100 µL der aktivsten Fraktion nach der Chromatographie an Superose™ 12 HR10/30 (50 µg/mL in Coating-Puffer) gefüllt und durch Inkubation über Nacht bei 4°C das Protein an die Wände der Mikrotiterplatten adsorbiert. Um nicht gebundenes Antigen zu entfernen, wurde jede Vertiefung 5mal mit PBS-Puffer gespült. Nicht besetzte Proteinbindungsplätze in den Vertiefungen konnten mit PBS-Puffer, der 1% BSA enthielt, blockiert werden (über Nacht, 4°C). Der Überschuß wurde wiederum 5 mal mit PBS-Puffer ausgewaschen. In die Vertiefungen wurden Verdünnungen der Antisera pipettiert (Volumen: 100 µL; Konzentration: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000). Dabei enthielt Reihe 1 das Antiserum von Kaninchen 1, Reihe 2 das Antiserum von Kaninchen 2. Zur Kontrolle diente ein Vergleichsserum nicht immunisierter Kaninchen (Reihe 3) und der Verdünnungspuffer ohne Serum (Reihe 4, PBS-Puffer, 1% BSA).

Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Vertiefungen wiederum 5 mal mit PBS-Puffer gespült und anschließend in jede 100 µL einer Lösung von mit Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpern (Behringwerke, Marburg; 1:400 verdünnt) einpipettiert. Die Inkubationszeit betrug hier 2h bei Raumtemperatur, gefolgt von den üblichen Waschvorgängen mit PBS-Puffer, bevor je 100 µL Substratlösung zupipettiert wurden. Die Substratlösung setzte sich wie folgt zusammen:

100 mL 0.1 M Na-acetat pH 6.0 wurden mit 13.3 μ L 30% H_2O_2 versetzt. Zu 9.9 mL davon wurden 0.1 mL einer Chromogen-Lösung (42 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in DMSO) gegeben.

Nach 60 min bei Raumtemperatur wurde durch Oxidation des Chromogens eine blaue Lösung erhalten, die sich durch Zugabe von 100 μ L 2 M H_2SO_4 und weiteren 30 min bei Raumtemperatur nach gelb verfärbte. Die Intensität des entstandenen Farbkomplexes und damit der Substratumsatz ist proportional der Menge an gebundenem Antikörper gegen Cyanamidhydratase. Die optische Dichte wurde bei 450 nm bestimmt (Titertek Multiscan Photometer). Die graphische Darstellung der Meßwerte zeigt, daß sowohl in Antiserum von Kaninchen 1 wie auch in Antiserum von Kaninchen 2 ein hoher Antikörpertiter vorhanden ist (Fig. 2). Das als Kontrolle eingesetzte Serum eines nicht immunisierten Kaninchens zeigt im Bereich geringer Verdünnung (1:40) relativ hohe Extinktionswerte, die auf eine unspezifische Bindung von Serumproteinen an die Microtiterplattenwände verursacht werden. Die Unspezifität dieser Bindung geht klar aus der rapiden Abnahme der Extinktionswerte bei weiterer Verdünnung des Serums hervor. Die Antisera der immunisierten Kaninchen zeigen trotz einer Verdünnung bis 1:20000 noch keinen befriedigenden Abfall der Extinktion (Fig.2). Deshalb sollte der ELISA-Test mit einer Verdünnung des Antiserums von 1:100 bis 1:200000 durchgeführt werden. Gleichzeitig wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Antigen beschichtet: Reihe 1: 50 μ g/mL; Reihe 2: 25 μ g/mL; Reihe 3: 12.5 μ g/mL; Reihe 4: 6 μ g/mL.

Die daraus resultierende Titrationskurve (Fig.3) zeigt nun deutlich die Abnahme der Extinktionswerte bei sehr hohen Serumverdünnungen. Als Antigenkonzentration zur Beschichtung der Mikrotiterplatten sollte bei folgenden ELISA-Tests 6 μ g/mL gewählt werden, da hierbei optimale Testbedingungen vorgefunden wurden (Fig. 3).

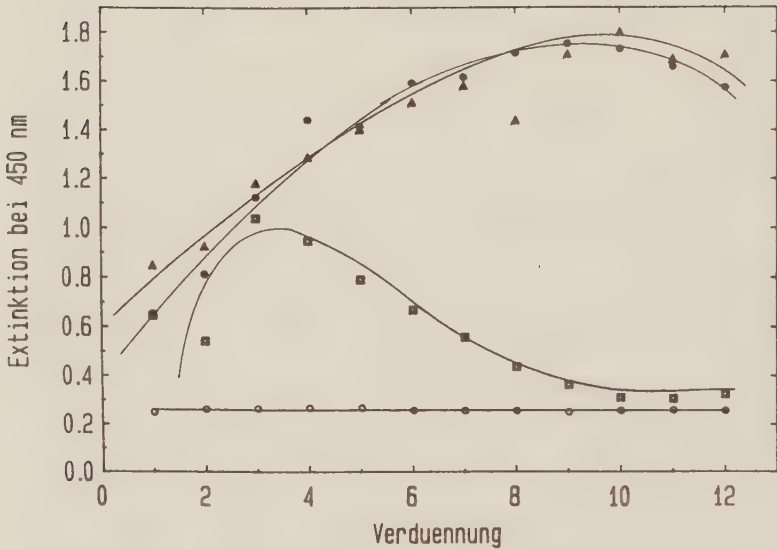


Fig. 2: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei geringer Verdünnung

Der Test wurde wie im Text beschrieben durchgeführt. Die auf der Abszisse gegebenen Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzem Wert einer Verdünnung auf die Hälfte. Der Wert 1 steht für eine Serumverdünnung von 1:10. Antigenkonzentration der Beschichtung: 50 µg/mL

- : Serum von Kaninchen 1
- ▲: Serum von Kaninchen 2
- : Serum nicht immunisierter Kaninchen
- : PBS/BSA

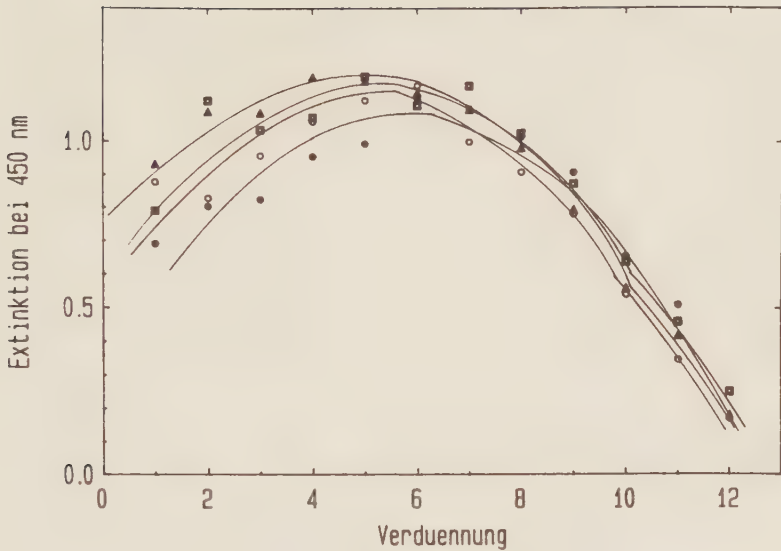


Fig. 3: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei hoher Verdünnung

Der ELISA-Test wurde wie im Text beschrieben durchgeführt. Die auf der Abszisse gegebenen Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzem Wert einer Verdünnung auf die Hälfte. Der Wert 1 steht für eine Serumverdünnung von 1:100. Eingesetzt wurde nur Serum von Kaninchen 2. Zur Kontrolle entspricht Wert 12 nur PBS/BSA.

Antigenkonzentration der Beschichtung:

- : 50 µg/mL
- : 25 µg/mL
- ▲ : 12.5 µg/mL
- : 6 µg/mL

Durch diese Tests läßt sich eindeutig belegen, daß die aus Kaninchensera gewonnenen Immunglobuline in der Lage sind, das Enzym Cyanamidhydratase zu erkennen und daran zu binden. Das Serum von Kaninchen 2 besitzt gegenüber dem von Kaninchen 1 einen nur leicht erhöhten Titer.

"Coating" Puffer:

7 mM Essigsäure
7 mM K_2HPO_4
170 mM NaCl
0.02 % NaN_3

PBS-Puffer:

10 mM Phosphat
10 mM NaCl
0.02% NaN_3
bei pH 7.4

Ausbluten der Kaninchen

(In Anlehnung an Hurn und Chantler 1980)

Die bisher durchgeführten Tests der Antisera bestätigten eine gute Ausbeute an spezifisch reagierenden Immunglobulinen. Zur Gewinnung einer größeren Menge an Serum mußten die Kaninchen ausgeblutet werden. Den zuvor narkotisierten Tieren wurde zuerst aus der Ohrvene, dann aus der freipräparierten Halsschlagader Blut bis zum Exitus entnommen (Kaninchen 1: 80 mL, Kaninchen 2: 110 mL) und das Serum wie für die Blutproben beschrieben isoliert (Kaninchen 1: 50 mL, Kaninchen 2: 90 mL). Nach Aliquotierung (je 10mal 1 mL, Rest in 20 mL Portionen) können die Sera bei $-70^{\circ}C$ über Jahre aufbewahrt werden. Auch für die nach dem Ausbluten erhaltenen Sera konnte in ELISA-Tests die Existenz von Cyanamidhydratase-spezifischen Immunglobulinen belegt werden (Fig. 4). Allerdings war der Antikörpertiter gegenüber der aus der Ohrvene entnommenen Probe (Fig. 2) geringfügig reduziert. Eine nochmalige "booster"-Injektion mit Antigen ohne Adjuvans hätte den Titer sich noch verbessert.

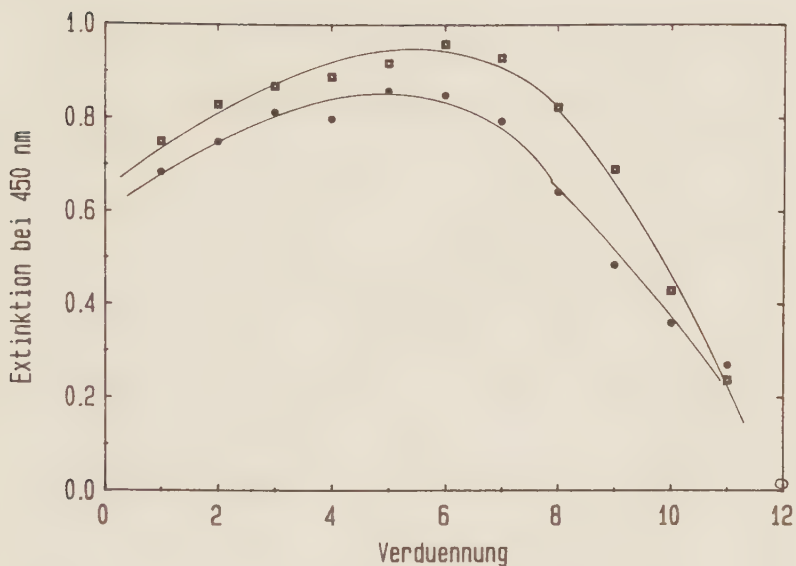


Fig. 4: ELISA-Test der Kaninchensera nach dem Ausbluten

Durchführung wie im Text beschrieben.

Die Verdünnungseinheiten auf der Abszisse entsprechen pro ganzem Wert einer 2fachen Verdünnung. Wert 1 steht für eine 1:10 Verdünnung der Sera. Zur Kontrolle wurde für Wert 12 nur PBS/BSA eingesetzt.

■ : Serum von Kaninchen 2

● : Serum von Kaninchen 1

Inhibierung des ELISA-Tests

Wird das Antiserum mit gelöstem Antigen vorinkubiert, sollte es nicht mehr mit dem an Microtiterplatten fixierten Antigen reagieren können. Diese Inhibition wäre ein weiterer Beweis für die Spezifität der Antisera. Dazu mußte eine Verdünnungsreihe in Eppendorfgefäßen hergestellt werden: Gefäß 1 enthielt 100 µL Antigenlösung (nach Chromatographie an Superose™ 12, 0.82 mg/mL), die Gefäße 2 bis 10 je 90 µL PBS-Puffer. Aus Gefäß 1 wurden 10 µL in Gefäß 2 pipettiert, vermischt und davon 10 µL in Gefäß 3 gegeben usw.. Zuletzt wurden aus jedem Gefäß 30 µL verworfen; zu den verbleibenden 60 µL kamen je 60 µL einer Serumverdünnung, welche im ELISA-Test zur höchsten Extinktion führte (1:3200, Fig. 3). Die Serumverdünnung im Reaktionsgefäß betrug damit 1:6400. Als Kontrolle wurde mit Gelatine, Human-Transferrin und BSA (jeweils 1mg/mL) die gleiche Verdünnungsreihe erstellt und mit Antiserum versetzt. Nach Inkubation aller Proben über Nacht bei 4°C wurden sie in die mit 6 µg/mL Antigen vorbeschichteten Microtiterplatten pipettiert und ein ELISA-Test wie beschrieben durchgeführt (Fig. 5). Lediglich das mit Cyanamidhydratase vorinkubierte Antiserum weist eine klare Inhibierung auf, während die Vorinkubation des Antiserums mit Gelatine, Human-Transferrin oder BSA zu keiner Beeinträchtigung der Antigen-Antikörper-Komplexbildung führt.

Immunelektrophorese

(in Anlehnung an Mage 1980)

Bei dieser Immunotechnik wird vor der Diffusion das Antigengemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Wie beim Ouchterlony-Test beschrieben wurden Objektträger mit Agarose ausgegossen, worauf nach Verfestigung mit einem Gelschneider eine Rinne und 2 Löcher in die Agarose gestanzt werden konnten (Fig. 6).

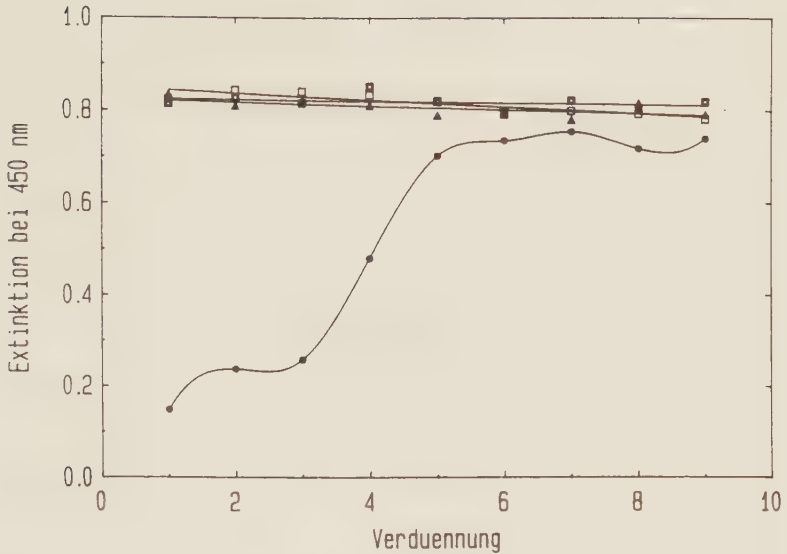


Fig. 5: Inhibierung des ELISA-Tests

Im Text ist die Durchführung des Versuches genau beschrieben. Die auf der Abszisse angegebene Verdünnung der Antigenlösung (820 $\mu\text{g/mL}$) steht pro ganzer Einheit für eine 10fache Verdünnung. Wert 1 entspricht der unverdünnten Lösung.

- : Antigen, mit Antiserum von Kaninchen 1 vorinkubiert
- ▲: Kontrolle: Antiserum mit BSA (Stammlösung 1 mg/mL) vorinkubiert
- : Kontrolle: Antiserum mit Human-Transferrin (Stammlösung 1 mg/mL) vorinkubiert
- : Kontrolle: Antiserum mit Gelatine (Stammlösung 1 mg/mL) vorinkubiert



Fig. 6: Immunpräzipitat nach der Immunelektrophorese, schematisch dargestellt

Im Text ist die Durchführung genau beschrieben.

1: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 (930 $\mu\text{g/mL}$, 10 μL)

2: Gelfiltrat nach SuperoseTM 12 HR10/30 (820 $\mu\text{g/mL}$, 10 μL)

3: Antiserum von Kaninchen 2 (80 μL)

Nach Absaugen der in den Löchern befindlichen Agarstückchen wurden diese mit Antigenlösung gefüllt (Loch 1: Sephadex G-100 10 μ L, 930 μ g/mL, Loch 2: Superose™ 12HR10/30 10 μ L, 820 μ g/mL) und in die dafür vorgesehene Halterung gelegt. Jede Elektrodenkammer wurde mit 700 mL Puffer (Diethylbarbitursäure-Acetatpuffer pH 8.6) gefüllt und über einen angefeuchteten Whatman3MM-Filterstreifen der Kontakt zum Objektträger hergestellt. Nach beendeter Elektrophorese (250V, 90 min) mußte zur Befüllung mit 80 μ L Antiserum die Agarose aus der vorgestanzten Rinne entfernt werden. Die Bildung der Immunpräzipitate erfolgte während 20h in einer Feuchtkammer, anschließend wurde mit PBS-Puffer zuerst 6h, dann mit frischem Puffer über Nacht gewaschen. Die Objektträger wurden für 1h in frisches Wasser gelegt und die Agarose bei 37°C getrocknet (durch Auflegen eines befeuchteten Filterpapierstreifens wurde eine gleichmäßige Trocknung erreicht).

Das gebildete Präzipitat nach dem Anfärben mit Amidoschwarz 10B zeigt nur die Ausbildung einer Präzipitationslinie sowohl nach der Chromatographie an Superose™ 12 sowie auch nach der Gelfiltration an Sephadex G-100 (Fig. 6). Im Gegensatz dazu würde man bei einem Serum, daß Antikörper gegen unterschiedliche Proteinein der gereinigten Cyanamidhydratase Präparation enthält, mehrere zum Teil unscharfe Präzipitationsbögen erhalten. Dies ist ein weiterer Beleg für die Spezifität der Antikörper.

Diethylbarbitursäure-Acetatpuffer pH 8.6:

10.8 g Natriumbarbiturat
 8.6 g Natriumacetat x 3 H₂O
 116.4 mL 0.1 n HCl
 2.0 g Natriumazid
 ad 1L mit H₂O dest.

Reinigung des Serums durch Immunoabsorption

(In Anlehnung an Hurn und Chantler 1980)

Da aus Erfahrung ungereinigte Antisera sehr oft unspezifische Kreuzreaktionen eingehen (Hurn und Chantler 1980), sollten diese Immunglobuline entfernt werden. Sehr gut eignet sich dazu eine Affinitätschromatographie an Sepharose. Über Hydroxylgruppen dieser Matrix auf Agarosebasis können biologisch aktive Moleküle schonend immobilisiert werden. Für Proteine wird bevorzugt CNBr-aktivierte Sepharose eingesetzt. Bromcyan reagiert mit den Hydroxylgruppen zu einem Imidocarbonat, welches wiederum mit primären Aminogruppen der Proteine eine Reaktion zu Isoharnstoff eingeht (Cuatrecasas *et al.* 1968, Pharmacia 1986).

Kopplung des Antigens an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

(nach Pharmacia 1986)

Für die Kopplung wurden 15 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B in 55 mL 1 mM HCl für 15 min gequollen. Zur Entfernung von Additiven wurde das Gel über einen gesinterten Glasfilter mit 1 mM HCl gut gewaschen (ca. 200 mL/g Trockenpulver). Als Antigen wurde das Gelfiltrat der aktiven Fraktionen nach Chromatographie über Sephadex G-100 eingesetzt, welches über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert worden war (50 mL enthalten 80 mg Protein). Da pro g Trockenpulver 5 mL Lösung verwendet werden sollten, wurden noch 30 mL Kopplungspuffer zugegeben; die Proteinkonzentration betrug ca. 1 mg/mL. Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C langsam geschüttelt. Nicht gebundener Ligand wurde mit Kopplungspuffer (3 x 500 mL) gewaschen und verbleibende aktive Gruppen mit 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (500 mL) blockiert (4°C, 1h). Anschließend wurde das Produkt 3x mit Salzlösungen unterschiedlichen pH's gewaschen (0.1 M Acetatpuffer mit 0.5 M NaCl pH 4.4, gefolgt von 0.1 M Tris-HCl mit 0.5 M NaCl pH 8.0), bevor das Material in azidhaltigem PBS-Puffer bei 4°C gelagert werden konnte.

Kopplungspuffer: 0.1 M NaHCO_3
 0.5 M NaCl pH 8.3

Chromatographie

Eine (30x1.5 cm) Säule wurde mit dem Gelmaterial befüllt und mit PBS-Puffer gespült, bevor 25 mL Antiserum von Kaninchen 2 auf die Säule gepumpt wurden (10 mL, 7h). Die Säule wurde über Nacht mit PBS-Puffer gespült, um nicht gebundene Immunglobuline zu entfernen. Zur Elution gebundener Antikörper wurde 3 M KSCN in PBS-Puffer verwendet und das Eluat in 2 mL Fraktionen gesammelt. Der Anteil an eluiertem Protein wurde durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt. Die Gipfelfraktionen 9-13 (Fig.7) wurden vereinigt (10 mL) und sofort gegen 5 L PBS-Puffer dialysiert, da KSCN wegen seiner chaotropen Eigenschaften sehr schnell Proteine irreversibel denaturieren kann (Murphy *et al.* 1976). Die Dialyse wurde mit frischem Puffer übers Wochenende fortgesetzt. Die gereinigten Antikörper (ca. 8 mL) wurden aliquotiert und bei -70°C eingefroren. In Fig. 8 ist ein ELISA-Test vor und nach der Reinigung gezeigt; der Antikörpertiter blieb erhalten.

Nach Verbrauch dieser Antikörper wurden die restlichen Sera nach einer von Murphy *et al.* 1976 vorgeschlagenen und bei Skrobranek (1988) genau beschriebenen Methode chromatographisch gereinigt. Dabei wird zur Abtrennung von KSCN nicht die mit Ausbeuteverlust behaftete Dialyse eingesetzt, sondern der CNBr-Sepharose das Molekularsieb Sephadex G-50 nachgeschaltet, was zu einer schnelleren Entsalzung der Proteinlösung führt.

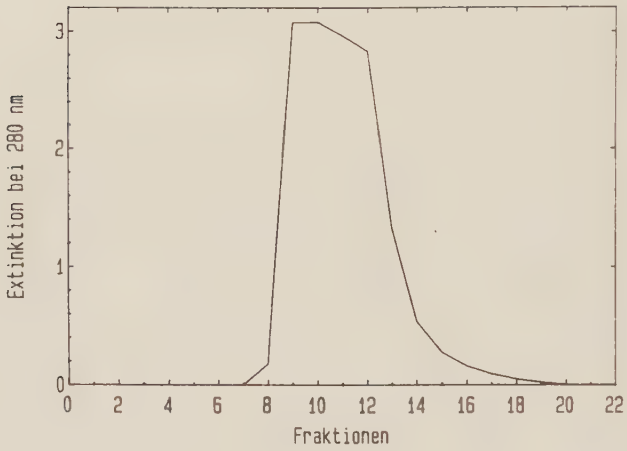


Fig. 7: Elutionsprofil der Immunoaffinitätschromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose 4B

Die Durchführung ist im Text genau beschrieben.

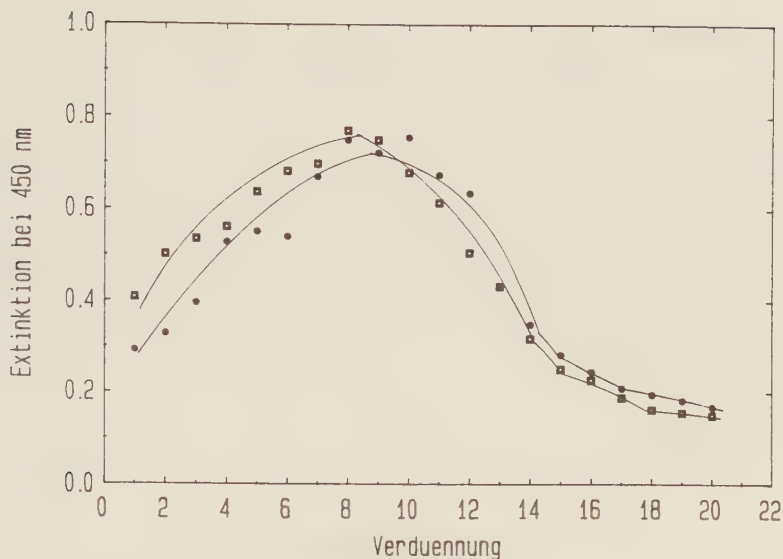


Fig. 8: ELISA-Test von Serum vor und nach der Immunoaffinitätschromatographie

Durchführung wie im Text beschrieben.

Die auf der Abszisse gegebenen Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzem Wert einer Verdünnung auf die Hälfte. Wert 1 steht für eine Serumverdünnung von 1:10.

- : Antiserum von Kaninchen 2 vor der Reinigung
- : Antiserum von Kaninchen 2 nach der Reinigung über CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt mit Antigen

Immunelektrophorese

(In Anlehnung an Mage 1980)

Der Erfolg der Reinigung sollte in einer Immunelektrophorese untersucht werden. Dabei wurde, wie bereits beschrieben, die Elektrophorese (250V, 90 min) mit Antiserum vor (2) und nach (1) der Chromatographie über CNBr-Sephrose durchgeführt. In die danach ausgehobene Rinne wurde ein Anti-Kaninchen-Antiserum gegeben und wie beschrieben weiterverfahren. Nach der Reinigung der Antikörper ist deutlich nur mehr eine Präzipitationslinie zu sehen im Gegensatz zu dem Spektrum an Linien vor der Reinigung (Fig. 9).



Fig. 9: Immunpräzipitat nach der Immunelektrophorese, schematisch dargestellt für das Serum von Kaninchen
2

1: Antikörperlösung nach Chromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose (10 µL)

2: Antikörperlösung vor der Chromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose (10 µL)

3: Antiserum gegen Kaninchen (vom Esel) (80 µL)

Western-Blot

Der immunchemische Nachweis von Proteinen, die durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, ist mit der Technik des "Western-Blot" zu erzielen (Renart 1979, Gibson 1981, Dziadek *et al.* 1983, Kaufmann *et al.* 1987), bei der die aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert werden. Am besten eignet sich dazu der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (BA-85 Schleicher und Schüll) in einem Puffersystem nach Towbin *et al.* (1979) in einer dafür vorgesehenen Elektrophorese-Kammer (Transphor, TE 42, Atlanta). Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese für 10 min in Transfer-Puffer equilibriert. Für den Transfer wurden 2 Whatman Filter sowie die Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und nachfolgendes "Sandwich" vorbereitet:

- a) Scotch-brite
- b) Whatman-Filterpapier 3MM
- c) Gel
- d) Nitrocellulose-Membran BA-85
- e) Whatman-Filterpapier 3MM
- f) Scotch-brite

Dieses "Sandwich" wurde zwischen eine Plastikhalterung gelegt und so in die mit Transfer-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gehängt, daß die Membran zur Anode hin orientiert ist.

Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum über Nacht bei 300 mA. Nach dem Transfer mußten durch Inkubation mit 3% BSA in TBS-Puffer (ca. 50 mL, 2h, Raumtemperatur) die nicht besetzten Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Überschüssiges BSA wurde durch 3maliges Waschen mit TBS entfernt. Anschließend konnte die Membran mit der Serumlösung (Verdünnung 1:300 in 50 mL 1% BSA/TBS) für 2h

bei Raumtemperatur (alternativ über Nacht bei 4°C) unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Danach wurde 4mal je 10 min mit TBS gewaschen. Die kreuzreagierenden Proteinbanden wurden unter Verwendung von Protein A (bindet an die Fc-Region von Immunglobulinen, Spiegelberg 1974), welches mit [125 J] radioaktiv markiert war (Bolton und Hunter 1973), sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran 2h bei Raumtemperatur mit [125 J]Protein A inkubiert (0.15 μ Ci/mL in 1% BSA/TBS) und nicht gebundene Radioaktivität durch 3maliges Waschen für 20 min mit je 100 mL TBS-Puffer entfernt. Nach dem Trocknen unter Rotlicht wurde die Membran autoradiographiert. Zur Größenbestimmung wurde die Gelspur mit den Markerproteinen vor dem Transfer mit einem Skalpell abgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris-HCl
 192 mM Glycin
 30 % Methanol

TBS-Puffer: 0.05 M Tris-HCl pH 8.0
 0.15 M NaCl

Immunpräzipitation

Diese Methode wurde in Anlehnung an Kessler (1981) modifiziert. Die Fixierung von Immunkomplexen kann mit Hilfe von Protein A Sepharose erreicht werden. Hierzu wurden 100 mg Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) in 1 mL Puffer A für 30 min bei Raumtemperatur gequollen und anschließend je 100 μ L dieser Suspension (ca. 10 mg Sepharose) mit 25 μ L gereinigtem Antiserum für 30 min bei 4°C geschüttelt. Da Protein A an die Fc-Region von Immunglobulinen (Spiegelberg 1974) bindet, wird somit die Fixierung an das Sepharosematerial erreicht. Während dessen

wurden die translatierten Proben (s. Ergebnisse: *in vitro* Translation von poly(A)mRNA, 15 µL) mit je 1 mL Puffer A bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Mit den so vorbereiteten Proben wurden die nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 12000 Upm) erhaltenen Sepharosegele 75 min bei 4°C geschüttelt, um die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zu erreichen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 12000 Upm) wurde das Sepharose-Material dreimal mit Puffer A sowie zweimal mit Puffer B gewaschen. Anschließend konnten die gebundenen Proteine durch Kochen in je 50 µL Lämmli-Puffer (Lämmli 1970) freigesetzt und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Da während der Translation [³⁵S]-Methionin eingebaut wurde, konnten die Proteine nach Trocknen der Gele durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Puffer A: 1% Triton X-100
 0.3M NaCl
 10 mM Tris-HCl pH 7.4
Puffer B: 10 mM Tris-HCl pH 7.4

Arbeiten mit Bakterien und Phagen

Vermehrung auf Agarplatten

Für Agarplatten wurde LB-Medium mit 15 g Agar pro Liter autoklaviert und nach Abkühlung auf etwa 50-60°C bei Bedarf mit Ampicillin (25 mg/mL; Konzentration im Medium: 50-100 µg/mL) versetzt. Die Lösung wurde in sterile Petrischalen (Durchmesser: 90 bzw. 145 mm) gegossen, die Oberfläche zur Eliminierung von Luftblasen abgeflammt und die Platten an Luft getrocknet. Die Platten wurden maximal 3 Wochen bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert. Bakterien aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur wurden mit einer sterilen Impföse auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Zur kurzen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden mit Parafilm verschlossene Agarplatten in umgekehrter Position bei 4°C gelagert. Sollten die Zellen für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, wurden Übernachtskulturen mit 25-50% Glycerin vermischt und bei -20 bzw. -80°C eingefroren (Glycerinkulturen).

Präparation von Bakterien zur Phageninfektion

50 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes (*E. coli* Y1090 bzw. Y1089) wurden bei 3000 Upm für 10 min (4°C) abzentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 25 mL sterilem SM-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO₄) resuspendiert und für höchstens acht Tage bei 4°C aufbewahrt.

Titerbestimmung

Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung in SM-Puffer hergestellt (100 μ L, 10^{-1} - 10^{-7} fach) und an 100 μ L Indikatorbakterien 20 min bei 37°C adsorbiert. Dieser Ansatz wurde zu 3 mL flüssiger Top-Agarose (0.8% in LB-Medium, 50°C), welchem bereits 20 μ L IPTG (20 mg/mL) und 50 μ L Xgal (20 mg/mL) zugesetzt waren, pipettiert, durchmischt, auf 37°C vorgewärmte LB-Platten (100 μ g/mL Ampicillin) ausplattiert und nach dem Verfestigen der Top-Agarose über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Titer der Stocklösung wird durch Multiplikation der Verdünnungsstufe mit der ermittelten Anzahl der Plaques (pfu) bestimmt.

Isolierung einzelner Phagenplaques

Ein deutlich abgesetzter Plaque wurde mit einer 200 μ L Pipettenspitze mit dem darunterliegenden Agar ausgestochen und zu 1 mL SM-Puffer, dem 2 Tropfen Chloroform zugesetzt waren, gegeben. Die Diffusion der Phagen ins Medium erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Ein Aliquot davon wurde zur Titerbestimmung eingesetzt. Aus einem einzelnen Plaque können bis zu 10^6 - 10^7 Phagen isoliert werden.

Herstellung transformationskompetenter Zellen (Aruffo und Seed 1987)

Mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes wurden 20 mL TYM-Medium (in einem 250 mL Gefäß) bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0.4-0.8 gezüchtet. Diese Anzucht wurde in 100 mL TYM-Medium (in einem 2L Gefäß) gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0.5-0.9 weitergezüchtet. Anschließend wurde auf 500 mL mit TYM-Medium verdünnt und die Zellen bis zu einer OD_{600} von 0.6 gezüchtet. In einem Eis/Wasserbad wurden die Zellen unter vorsichtigem

Schütteln schnell abgekühlt und in einem vorgekühlten GS-3 Becher 15 min bei 4200 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 100 mL TfBI-Puffer (vorgekühlt) suspendiert, für 8 min bei 4200 Upm (4°C) zentrifugiert und der Niederschlag in 20 mL vorgekühltem TfbII-Puffer aufgenommen. Aliquots à 200 µL wurden im Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TfBI-Puffer: 30 mM K-acetat
 50 mM $\text{MgCl}_2 \cdot x4\text{H}_2\text{O}$
 100 mM KCl
 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$
 15% Glycerin
 TfbII-Puffer: 10 mM MOPS pH 7.0
 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$
 10 mM KCl
 15% Glycerin

Transformation der Bakterien

Die bei -80°C tiefgefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der aufzunehmenden DNA (30-50 ng; meistens die Hälfte eines Ligaseansatzes) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2minütigem Hitzeschock bei 42°C wurde zum Transformationsansatz 1 mL eines auf 37°C vorgewärmten LB-Mediums gegeben und für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 50-200 µL Aliquots des Ansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche ein geeignetes Antibiotikum enthielten, das die Selektion auf transformierte Bakterien ermöglicht. Bei den pUC-Plasmiden konnte durch Zugabe von 40 µL X-Gal-Lösung (20 mg/mL in DMF) pro Platte eine Blaufärbung nicht rekombinanter Kolonien erreicht werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Lambda-gt11 Lysogene in E. coli Y1089
(in Anlehnung an Snyder et al. 1987)

250 µL einer Übernachtskultur von *E. coli* Y1089, gezogen in LB-Medium unter Zusatz von 0.2% Maltose und 50 µg/mL Ampicilin, wurden mit einer 10 mal größeren Phagendichte eines Lambda-gt11 Klons infiziert. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf LB-Platten (5-15 µL pro Platte) ausplattiert und über Nacht bei 32°C inkubiert. Einzelkolonien der Bakterien wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf frische LB-Platten im markierten Raster doppelt gepickt und eine Platte bei 32°C, eine andere bei 42°C über Nacht inkubiert. Nur Klone, die bei 32°C wachsen, sind Lysogene (ca. 30-50% der gepickten Kolonien).

Schnellpräparation von Proteinlysaten der Lysogenen

5 mL LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie der lysogenen Zellen angeimpft und bei 30°C bis zu einer $OD_{600nm} = 0.4$ inkubiert. Die Induktion erfolgte durch 20minütige Inkubation bei 42°C. Nach Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 10 mM im Medium wurde für 1h bei 37°C unter Schütteln weiterinkubiert. Die Zellen wurden in 2 mL Eppendorfgefäßen bei 5000 rpm abzentrifugiert, mit je 150 µL Lämmli-puffer versetzt und bei -70°C tiefgefroren. 60 µL Aliquots der Proben wurden 5 min gekocht, auf einem 17%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt.

DNA-Isolierungen

Schnelle Isolierung von Lambda-DNA

Zur Isolierung von Lambda-DNA wurde zunächst die Platten-Lysat-Methode nach Maniatis et al. (1982) eingesetzt. Im

späteren Verlauf der Arbeit wurde bevorzugt die Isolierung mit LambdaSorbTM Phage Adsorbent (Promega) genau nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Die Phagen-Platten für beide Methoden wurden mit 5 mL (90 mm) bzw. 10 mL (150 mm) SM-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgSO₄) über Nacht bei 4°C überschichtet. Der Überstand wurde abpipettiert, von Agarose abzentrifugiert (10 min, 3000 Upm, 4°C) und zur Isolierung eingesetzt. Sollte der Überstand längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden, wurde 0.3 % Chloroform zugesetzt.

Nach Adsorption der Phagenpartikel an das Material kann mit kleinen Volumina in Eppendorf-Gefäßen weitergearbeitet werden, was von großem Vorteil bei der Isolierung vieler verschiedener rekombinanter Phagen-DNAs nebeneinander ist.

Plasmid-Schnellpräparation (Heinrich, pers. Mitteilung)

Aus einer 5 mL Übernachtskultur der zu überprüfenden Transformanden wurden Zellen aus 2 mL durch Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge geerntet und der Bakterienniederschlag 2 x mit je 1 mL Wasser Medium-frei gewaschen, bevor der Niederschlag in 200 µL 10 mM EDTA suspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Durch Zugabe von 400 µL frischer alkalischer Detergenslösung (0.2 N NaOH, 1% SDS) und einer weiteren Inkubation (10 min, 0°C) wurde die komplette Lysis der Bakterien erreicht. Anschließend wurden 300 µL 3 M Natriumacetat zugegeben und nach weiteren 20 min auf Eis das ausgefallene SDS und zelluläre Protein durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 13000 Upm, Sigma-Zentrifuge). Der klare Überstand wurde mit Phenol/Chloroform, gefolgt von Chloroform extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol gefällt (10 min, -70°C) und durch Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, Sigma-Zentrifuge) isoliert. Zur Entfernung von Salzverunreinigungen wurde das Pellet mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert

(s.o.), bevor es lyophilisiert und in autoklaviertem Wasser gelöst wurde.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen
(nach Winberg und Hammarskjöld 1980)

Nach Auftrennung des DNA-Gemisches auf einem Agarosegel wurde unter UV-Licht (366 nm) vor der zu isolierenden DNA (bei der cDNA-Synthese ab 500 bp) mit einem Skalpell ein Schnitt in der Breite der Bande gesetzt und eine ebenso große, vorbehandelte DEAE-Cellulosemembran (Schleicher und Schüll, NA-45) eingesetzt, an welcher bei Fortsetzung der Elektrophorese die DNA gebunden wurde. Unter UV-Licht war die DNA als rot fluoreszierende Bande auf der Membran sichtbar. Nicht fluoreszierende Bereiche wurden abgeschnitten und noch anhaftende Agarosestückchen mit NET-Puffer (0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) abgewaschen. Die Membran wurde in ein Eppendorfggefäß überführt und mit NET-Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) überschichtet. Durch 45minütiges Erhitzen des Filters auf 65°C konnte die gebundene DNA freigesetzt werden. Das im Eluat enthaltene Ethidiumbromid wurde durch Extraktion mit wassergesättigtem 1-Butanol entfernt. Die DNA konnte anschließend mit 2.5 Volumen Ethanol präzipitiert werden.

Vorbehandlung der Cellulosemembran: 10 min mit 10 mM EDTA pH 7.6, 5 min mit 0.5 M NaCl und anschließend mehrmals mit Wasser waschen; aufbewahren in autoklaviertem Wasser bei 4°C.

Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen
(In Anlehnung an Maxam und Gilbert 1980)

Dieses Verfahren wurde für die Isolierung von DNA-Fragmenten bis 1000 bp Größe verwendet.

Das DNA-Fragmentgemisch wurde über ein 7.5%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel anschließend für 15 min mit Ethidiumbromid (0.5 µg/mL H₂O) angefärbt und die

interessierenden Banden nach Lokalisierung unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden fein zerkleinert, in einem Eppendorfgefäß mit H_2O (ca. 300-400 μL) bedeckt und die DNA über Nacht unter leichtem Schütteln eluiert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 4°C, 10 min) wurde das Eluat von Gelresten befreit, indem es durch eine blaue Pipettenspitze, deren Spitze mit silanisierter Glaswolle gestopft war, gedrückt wurde. Die DNA wurde mit 100 mM $MgCl_2$, 1/10 Vol. 3 M Na-acetat pH 6.0 und 2.5 Vol. EtOH präzipitiert.

Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäure-Lösungen

Die Absorption einer Probe wurde bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. 1 OD_{260} entspricht 50 $\mu g/mL$ dsDNA bzw. 40 $\mu g/mL$ RNA oder 20 $\mu g/mL$ Oligonukleotide (Maniatis et al. 1982). Reine Nucleinsäure-Präparationen haben einen $OD_{260}/_{280}$ Quotienten von mindestens 1.8 (Jaenicke 1966).

Enzymatische Reaktionen an DNA

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur hydrolytischen Spaltung wurde die DNA in einer Konzentration von 5-50 μg eingesetzt. Die für das verwendete Restriktionsenzym nötige Salzkonzentration wurde in den meisten Fällen mit einem 10fach konzentrierten Standard-Puffer (Niedrig-, Mittel-, Hoch- und Superhochsalzpuffer) nach Maniatis et al. (1982) eingestellt. Alternativ dazu wurde auch das 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim, Mannheim benutzt. Die Hydrolyse erfolgte normalerweise 3-4h bei 37°C, wenn vom Hersteller nicht anders angegeben. Pro 1 μg zu spaltender DNA wurden 1-10 Einheiten des Restriktionsenzym zum Ansatz gegeben. Die Reaktion wurde entweder durch Phenolisierung des

Ansatzes oder durch Zugabe von 1/10 Volumen Gelauftragspuffer (0.25% Bromphenolblau; 0.25% Xylencyanol; 100 mM EDTA, pH 8.0; 20% Ficoll 400) beendet.

Klonierung in Lambda-gt11 und in vitro Verpackung (nach Promega, Technical Bulletin)

Gearbeitet wurde mit dem Proclonone™ Lambda-gt11 System von Promega, welches die mit *EcoRI* hydrolysierten und mit Phosphatase behandelten Lambda-gt11 Vektorarme sowie den zur *in vitro* Verpackung nötigen Bakterienstamm enthält.

Ein typischer Ligaseansatz: 4 µL (0.3 µg) cDNA
 1.5 µL (0.75 µg) Lambda-gt11
 0.6 µL H₂O
 0.7 µL 10x Ligasepuffer
 0.7 µL (0.7 U) T4 DNA-Ligase

10x Ligasepuffer: 300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂,
 100 mM DTT, 4 mM ATP

Bei der Berechnung der Ligaseansätze mit eigener cDNA sollte das für die Kontrolle angegebene Vektor:Insert Mengenverhältnis von 2.5:1 genau eingehalten werden, da damit die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Inkubation des Ligaseansatzes erfolgte über Nacht (14-16h) bei 12°C.

In vitro Verpackung

Der bei -70°C gelagerte Extrakt wurde auf Eis bis zur dicklichen Konsistenz aufgetaut (nicht, bis er ganz flüssig ist, da es sonst wegen der starken Temperaturempfindlichkeit der Extrakte zu einer schlechten Verpackungseffizienz kommt) und der gesamte Ligaseansatz (max. 10 µL) zugesetzt, vorsichtig gemischt und 2h bei 22°C inkubiert. Danach wurden 500 µL SM-Puffer und 25 µL Chloroform zugegeben und die Verpackungseffizienz durch

Titerbestimmung ermittelt. Die Phagenlösung kann bei 4°C aufbewahrt werden.

Ligation der cDNA in pUC-Vektoren

Zur Klonierung wurden 40-60 ng cDNA mit *EcoRI* linearisiertem und mit alkalischer Phosphatase behandeltem pUC13 Vektor (Pharmacia) durch T4 DNA-Ligase verknüpft. Da die cDNA nach der "Spun-column" Chromatographie direkt eingesetzt werden konnte, war ein typischer Ligaseansatz wie folgt zusammengesetzt:

- 10 µL (40ng) cDNA
- 20 µL Säulenpuffer
- 2 µL (100 ng) pUC 13 Vektor
- 3 µL 1:10 verdünntes ATP (Pharmacia-Lösung)
- 1 µL (1 U) T4 DNA-Ligase

Dieser Ansatz wurde für 16h bei 12°C inkubiert. Die Hälfte des Ligaseansatzes wurde zur Transformation eingesetzt, der Rest bei -20°C aufbewahrt.

Säulenpuffer: 66 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂,
15 mM DTT, 1mM Spermidin, BSA 0.2 mg/mL

Hybridisierung

Transfer von RNA auf Nylonmembranen

(nach Thomas 1980 bzw. Southern 1975)

RNA

Das Gel mit der aufgetrennten RNA-Probe wurde für 45 min in 10 x SSC-Puffer geschüttelt. Inzwischen wurden zwei Whatman 3 MM Filter, die Membran und ein etwa 10 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern auf Gelgröße zugeschnitten. Das Gel wurde auf Whatman 3 MM Papierstreifen gelegt, die so über ein Plastikgitter gezogen waren, daß sie durch Eintauchen

in ein Vorratsgefäß mit Blot-Puffer (20 x SSC) die Flüssigkeit hochsaugten. Auf das Gel wurden die in 20 x SSC-Puffer für 10 min equilibrierte Membran, die zwei gleichgroßen Whatman 3 MM Filter und die Papiertücher gestapelt, wobei vorhandene Luftblasen sorgfältig entfernt wurden. Die Ränder des Filters wurden mit Plastikfolie abgedeckt. Der für den Transfer nötige Kapillareffekt wurde durch Beschweren des Stapels mit ca. 1 kg Gewicht erzeugt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Fixierung der Nucleinsäuren mußte die Membran 2h bei 80°C gebacken werden.

20x SSC-Puffer: 175.3 g NaCl

88.2 g Na-Citrat in 800 mL H₂O lösen

pH mit 10 n HCl auf 7.0 einstellen

ad 1 L mit H₂O auffüllen

Northernblot

(Selden 1987)

Der bei 80°C gebackene Filter (Hybond-C, Amersham) wurde mit 10 mL Vorhybridisierungslösung luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 40°C inkubiert. Die radioaktive Probe wurde 5 min gekocht und zu 10 mL Hybridisierungslösung gegeben. Die Vorhybridisierungslösung wurde entfernt, durch Hybridisierungslösung mit DNA-Probe ersetzt und nach dem Einschweißen über Nacht bei 40°C inkubiert. Der Filter wurde bei Raumtemperatur mit 1 x SSPE/0.1% SDS (3x 10 min) gefolgt von 0.25 xSSPE/0.1% SDS (2x 15 min) gewaschen und autoradiographiert.

Vorhybridisierungslösung: 25 mM KPO₄ pH 7.4

5x SSC

5x Denhardt's Lösung

50 µg/mL Heringssperma DNA

50% Formamid

Hybridisierungslösung: analog Vorhybridisierungslösung
mit 10% Dextransulfat (Sigma)

20x SSPE-Puffer: 174 g NaCl
27.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
7.4 g EDTA in 800 mL H_2O lösen
pH mit 10 n NaOH auf 7.4 einstellen
ad 1 L mit H_2O auffüllen

Radioaktive Markierung von DNA-Proben

"Random primed" Methode

Größere DNA-Proben (1000 bp Fragment für Northern-Blot) wurde nach der "Random primed" Methode (Feinstein und Vogelstein 1984) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham) markiert. Dazu wurde das Random Primed DNA Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim eingesetzt und genau nach Protokoll vorgegangen. Ein Aliquot der Reaktion wurde auf einem 7.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, um den Erfolg der Markierung zu überprüfen.

$[\text{}^{32}\text{P}]$ -Markierung von Oligonukleotiden mit T4-

Polynukleotidkinase

(In Anlehnung an Maniatis *et al.* 1982)

Oligonukleotide mit einer freien 5'OH-Gruppe können durch Phosphorylierung mittels T4-Polynukleotidkinase und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP markiert werden.

Für einen typischen Reaktionsansatz wurde eingesetzt:

200 ng Oligonukleotid
200 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP
2.8 μL 10x Kinasepuffer
20 U T4-Polynukleotidkinase

Gesamtvolumen: 28 μL Inkubationszeit: 45 min, 37°C

10x Kinasepuffer: 67 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT

Die Markierung wurde durch Papierchromatographie überprüft (Whatman 3MM). Dazu wurde ein 1 μL Aliquot des mit H_2O auf 200 μL aufgefüllten Reaktionsansatzes zur Chromatographie eingesetzt (Laufzeit: 2-3h). Nach dem Trocknen wurde der Chromatographiestreifen in gleiche Teile geschnitten und die Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt. Für eine erfolgreiche Kinasierung sollten mindestens 30% der Gesamtradioaktivität auf der Auftragsstelle verbleiben.

Fließmittel: 245 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ; 255 mL 0.2 M NaH_2PO_4 ;
500 mL H_2O ; 600 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 20 mL n-Propanol

Immun-Screening

(In Anlehnung an Young und Davis 1983a, Huynh *et al.* 1985)

Nach einer Titerbestimmung der Genbank wurden ca. 2000 Phagenplaques pro LB-Agarplatte (150 mm) mit 500 μL *E. coli* Y1090 (s.o.) ausgesät und für 3h bei 42°C inkubiert. Inzwischen wurden die Nitrocellulosefilter (BA 85, 132 mm, Schleicher und Schüll) in steril filtrierter 10 mM IPTG Lösung getränkt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die so vorbereiteten Filter konnten bei Raumtemperatur mehrere Tage aufbewahrt werden. Die Filter wurden numeriert und ca. 30 min auf 37°C erwärmt, bevor sie luftblasenfrei auf die Agarplatten, auf denen inzwischen kleine Plaques zu sehen waren, aufgebracht wurden. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht weiter inkubiert. Um die Top-Agarose beim Abziehen der Filter nicht mitzureißen, wurden die Platten zuvor 30 min bei 4°C gekühlt. Nach Markierung der Filterposition mit einer sterilen Nadel wurden sie von den Platten abgezogen, zuerst mit TBS (20 mL pro Filter) gespült und anschließend die nicht besetzten Stellen mit 5% BSA/TBS abgesättigt (ca. 8h bei 4°C). Die über CNBr-Sepharose gereinigten Antikörper

wurden 1:100 in 1% BSA/TBS verdünnt und mit *E. coli* Lysat (1:100, 20 mg/mL, Promega) für 60 min zur Vermeidung von unspezifischem Hintergrund vorinkubiert. In diese Lösung (10 mL pro Filter) wurden die Filter einzeln nacheinander gelegt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Bis zu 10 Filter wurden in einer Schale behandelt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Filter sich weder berühren noch aneinanderkleben. Die Antikörper enthaltende Lösung kann mehrmals benutzt werden (aufbewahren bei 4°C). Anschließend wurden die Filter 8 x 15 min mit 2% Milchpulver/0.1% NP-40 in TBS bei 4°C gewaschen (20 mL pro Filter), bevor sie für 2h mit 0.2 µCi/mL [¹²⁵J]-ProteinA (Amersham) in 2% Milchpulver/0.1% NP-40/TBS inkubiert wurden (10 mL pro Filter). Es folgte wiederum der Waschvorgang mit 2% Milchpulver/0.1% NP-40/TBS für 8 x 15 min bei 4°C, bevor die Filter auf Whatman 3MM Papier kurz getrocknet und über Nacht autoradiographiert wurden.

Autoradiographie

In einer Kassette mit Verstärkerfolie wurden die getrockneten Filter auf Whatman 3MM Papier mit Klebestreifen fixiert und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Darauf wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR oder Fudji RX-100) gelegt und bei -70°C exponiert.

RNA-Isolierung

Ein großes Problem bei der Isolierung von mRNA ist eine mögliche Kontamination aller eingesetzten Glaswaren, Geräte und Lösungen mit exogenen RNasen. Zur Beseitigung solcher Kontaminationen wurden alle Glaswaren mit einer 0.1 %igen Diethylpyrocacarbonat-Lösung (DEPC) behandelt (über Nacht im Abzug stehen lassen), zur Entfernung von überschüssigem DEPC autoklaviert und anschließend über Nacht bei 180°C

ausgeheizt (Blumberg 1987). Der gleichen Behandlung wurden alle benötigten Zentrifugenbecher, Spatel, Nylontücher und der Ultraturrax unterzogen. Soweit wie möglich bekamen sterile Plastikwaren den Vorzug. Mit Ausnahme von Tris-Puffern - deren Bereitung erfolgte unter Einsatz von DEPC-behandeltem bidestilliertem Wasser - wurden alle Lösungen mit 0.1% DEPC für 10 min heftig gerührt und dann autoklaviert. Außerdem galt generell das Gebot der Verwendung von Einmalhandschuhen.

Pilzzucht für RNA

Mit einer 50 mL Dauerkultur von *Myrothecium verrucaria* (siehe Methoden) wurde 1 L Medium beimpft, worauf die während 6-7 Tagen gewachsenen Pilzzellen auf 8x1 L Fernbachkolben zur Verteilung kamen. Erntereif waren diese Kulturen nach wiederum 6-7 Tagen Wachstum. Einen Tag vor der Ernte, die bei 4°C über einem Nylontuch erfolgte, wurde aus jedem Kolben etwas Medium auf eine LB-Platte (siehe Methoden) ausgestrichen. Zeigte sich nach Inkubation über Nacht bei 37°C kein Bakterienwachstum, so konnten die jeweiligen Kulturen zur RNA-Isolierung herangezogen werden.

Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe der Detergens-Phenol-Methode

(in Anlehnung an Slater 1984)

Das gut entwässerte Pilzmaterial (ca. 90 g Naßgewicht) wurde sofort bei 4°C in 180 mL Detergenslösung gegeben und ca. 2 min mit dem Messerhomogenisator (Ultraturrax Typ I45) zerkleinert. Nach Aufteilung des Homogenates auf zwei GS3 Becher und Zusatz des gleichen Volumens an Deproteinierungs-Lösung wurde 15 min bis zum Erhalt einer stabilen Emulsion geschüttelt. Die Aufbewahrung der durch Zentrifugation (15 min, 8000 Upm, 4°C, GS3 Rotor)

gewonnenen wässrigen Phase erfolgte bei 4°C in einem weiteren Satz an Zentrifugenbechern, in dem bereits je 100 mL Deproteinierungs-Lösung vorgelegt waren. Durch Reextraktion der verbleibenden Phenol- und der proteinhaltigen Interphase mit je 10 mL Detergens-Lösung und anschließender Isolierung der wässrigen Phase wie oben konnte die Ausbeute nochmals gesteigert werden. Nach Vereinigung mit der in Deproteinierungs-Lösung vorliegenden Präparation wurde nochmals 20 min heftig geschüttelt, zentrifugiert (15 min, 8000 Upm, 4°C, GS3 Rotor) und aus der wässrigen Phase (2x 120 mL) mit 2.5 Vol. EtOH die Nucleinsäuren über Nacht bei -20°C präzipitiert. In dieser Lösung ist RNA längere Zeit stabil lagerfähig.

Phenol-Mischung: 250 g Phenol p.a. redestilliert
 35 mL m-Kresol
 0.25 g 8-Hydroxychinolin
 75 mL H₂O_{bidest.} (DEPC behandelt)

Durch Erhitzen auf ca. 60°C wurde die Mischung wassergesättigt und in einer dunklen Flasche bei 4°C (für ca. 2 Monate) aufbewahrt.

Detergens-Lösung: 2 g Natrium-triisopropylnaphtalin-sulfonat (TPNS)
 12 g Na-salicylat
 10 mL Phenol-Mischung
 ad 200 mL mit 50 mM Tris-HCl pH 8.5
 Es ist wichtig, zuerst TPNS in der Phenol-Mischung zu lösen.

Deproteinierungs-Lösung: 1:1 Mischung von Phenol und Chloroform (24:1 Isoamylalkohol)

Extraktion mit heißem Phenol

Dazu wurde nach Zentrifugation der Ethanolpräzipitation (30 min, 8500 Upm, 4°C, GS3 Rotor) das erhaltene Pellet 5 min im Vakuum getrocknet, in insgesamt 40 mL 10 mM TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) suspendiert und auf zwei sterile Falcon-Röhrchen (50 mL) verteilt. Dazu kamen jeweils 20 mL einer auf 60°C erwärmten Phenolmischung (s. o.), worauf 5 min bei 60°C geschüttelt wurde. Die nach der Zentrifugation (3000 Upm, 20°C, Labofuge) erneut deutlich sichtbare Interphase zeugte von einer Abtrennung weiterer störender Proteine. Zur Steigerung des Reinheitsgrades wurde dieser Vorgang mit der wässrigen Phase noch 2-3 mal mit auf 60°C erwärmter Phenol/Chloroform-Mischung wiederholt, bis keine Interphase mehr zu beobachten war. Nach Extraktion noch enthaltenen Phenols mit Chloroform (24:1 Chloroform : Isoamylalkohol) bei Raumtemperatur konnte die RNA aus der wässrigen Phase mit 1/10 Vol. Na-acetat und 2.5 Vol. EtOH über Nacht bei -20°C präzipitiert werden.

Reinigung über Qiagen-Anionenaustauscher-Säule (in Anlehnung an "The Qiagenologist", Application Protocols)

Zum Auftragen wurde die in EtOH vorliegende RNA abzentrifugiert (20 min, 10000 Upm, 4°C) und das Pellet in H₂O ~~b i d e s t.~~ (DEPC behandelt) gelöst (0.5-1 mL), wobei unlösliche Partikel durch nochmalige Zentrifugation (3000 Upm, 20°C, Labofuge) abgetrennt werden konnten.

Auf eine Qiagen-Pack 500 Säule wurden max. 1 mg einer klaren Nucleinsäuren-Lösung aufgetragen.

Hierzu wurde die entsprechende Probe mit 5 M NaCl und 1 M MOPS pH 7.0 auf eine Salzkonzentration von 400 mM NaCl und 50 mM MOPS eingestellt. Die pro mL zugesetzten 100 U RNasin dienten zum Schutz vor endo- und exogenen RNasen (Blackburn 1977). Nach Equilibrierung der Säule mit 5 mL Puffer A

(nach Herstellervorschrift) wurden ca. 4 mL Probe bei einer Flußgeschwindigkeit von etwa 0.5 mL/min aufgetragen und nicht gebundene Proteine mit insgesamt 15 mL Puffer A (Fluß: 2 mL/min) entfernt. Kleine RNA-Moleküle (tRNA, 4S RNA) wurden durch Spülen mit 5 mL Puffer B (650 mM NaCl) abgetrennt. Durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M NaCl konnte die RNA mit 5 mL Puffer C (Fluß: 1 mL/min) eluiert werden, DNA blieb unter diesen Bedingungen an den Austauscher gebunden. Das Eluat wurde mit 2.5 Vol. EtOH versetzt und die enthaltene RNA über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Puffer A: 400 mM NaCl
 50 mM MOPS
 15 % EtOH
 pH 7.0

Puffer C: 1000 mM NaCl
 50 mM MOPS
 15 % EtOH
 pH 7.0

Puffer B: 650 mM NaCl
 50 mM MOPS
 15 % EtOH
 pH 7.0

Anreicherung von Poly(A)mRNA

(In Anlehnung an Maniatis *et al.* 1982 und Slater 1984)

Gearbeitet wurde bei Raumtemperatur, da den Puffern zum Schutz vor exogenen RNasen zugesetztes SDS (0.2%) bei niedrigerer Temperatur als Salz auskristallisiert und die Säule blockiert.

Zur Aktivierung des Materials wurden pro mg RNA 100 mg Oligo(dT)-Cellulose (Boehringer Mannheim) in 2 mL 0.1 n NaOH suspendiert, 10 min bei Raumtemperatur gequollen und zur Abtrennung von "fines" 5 min zentrifugiert (3000 Upm, Labofuge). Der Überstand wurde verworfen, die Cellulose in H₂O *videtur* (DEPC behandelt!) suspendiert und in eine 1 mL Insulinspritze, die mit etwas silanisierter Glaswolle

abgedichtet war, gefüllt. Nach Spülung mit H_2O ~~bidest~~ bis zu neutralem pH-Wert (pH-Papier) wurde die Säule mit 2 mL Oligo-Elutions-Puffer, anschließend mit 2 mL Oligo-Bindungs-Puffer equilibriert. Inzwischen wurde die benötigte Menge RNA (ca. 1mg) zentrifugiert (15 min, 10000 Upm, 4°C), mit 4 mL 70 % EtOH gewaschen, rezentrifugiert (s.o.) und das Pellet 5 min i. V. getrocknet, bevor es in 1.5 mL Oligo-Elutions-Puffer aufgenommen wurde. Zur Auflösung der RNA- Sekundärstruktur mußte die Lösung 10 min auf 70°C erhitzt und dann im Eisbad kurz abgekühlt werden. Unlösliche Partikel konnten durch 5 minütiges Zentrifugieren (3000 Upm, Labofuge) entfernt werden, worauf der Überstand mit 4 x Oligo-Bindungs-Puffer auf eine Endkonzentration von 0.5 M LiCl gebracht und auf die equilibrierte Säule aufgetragen wurde (Flußgeschwindigkeit ca. 10 mL/h). Um auch nicht sofort bindende RNA-Moleküle zu erfassen, wurde das gesamte sowohl während des Auftragens als auch beim nachfolgenden Spülen mit 500 µL Oligo-Bindungs-Puffer gesammelte Eluat nochmals für 10 min auf 70°C erhitzt, im Eisbad gekühlt und ein zweites Mal auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit Oligo-Bindungs-Puffer (2-3 mL) solange gespült, bis keine Nukleinsäuren mehr im Eluat nachzuweisen waren. Zur Kontrolle diente eine Extinktionsmessung bei 260 nm; war keine Extinktion mehr feststellbar, wurden restliche RNA-Spuren im empfindlichen "Tüpfeltest" nachgewiesen. Dazu wurden in eine Tüpfelplatte zu 20 µL Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/mL) je 3 µL der zu überprüfenden Lösung pipettiert. Ließ sich im UV-Licht (366 nm) im Vergleich zu einem 3 µL Bindungs-Puffer enthaltenden Testansatz keine fluoreszierenden Nukleinsäuren mehr nachweisen, wurde die Poly(A)-mRNA mit Elutions-Puffer (ca. 3 mL) freigesetzt und in 500 µL Fraktionen gesammelt. Ein mit den einzelnen Fraktionen durchgeführter Tüpfeltest ergab eine absolut reproduzierbare Elution von Poly(A)mRNA in Fraktion 2 (Hauptanteil) und Fraktion 3. Nach Vereinigung der Fraktionen mußte enthaltenes SDS entfernt werden, was durch

Präzipitation während 30 min bei 4°C gelang. Durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, 4°C, Sigma-Zentrifuge) konnte das ausgefallene SDS abgetrennt werden. Der Überstand wurde mit 1/10 Vol. 3 M Na-acetat pH 6.0 und 2.5 Vol. EtOH über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde 30 min bei 50000 Upm (4°C, SW56 Ti-Rotor) zentrifugiert, i. V. 5 min getrocknet, in 10-20 µL H₂O ^{des} aufgenommen, 10 min bei 70°C gelöst und bei -70°C aufbewahrt.

4x Oligo-Bindungs-Puffer:

4 mL Tris-HCl pH 7.5
 0.4 mL 0.5 M EDTA
 40 mL 2.5 M LiCl
 ad 50 mL mit H₂O (DEPC behandelt) auffüllen

Oligo-Bindungs-Puffer:

1 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5
 0.1 mL 0.5 M EDTA
 10 mL 2.5 M LiCl
 250 µL 20% SDS
 ad 50 mL mit H₂O auffüllen

Oligo-Elutionspuffer:

2 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5
 0.2 mL 0.5 M EDTA
 ad 100 mL mit H₂O auffüllen

CsCl- Gradientenzentrifugation

(in Anlehnung an Aruffo und Seed 1987)

Das RNA-Präzipitat wurde in 12 mL 10 mM TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) aufgenommen, 5 min auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Pro Zentrifugenbecher wurde einpipettiert:

1.5 mL CsCl-Lösung (1.26g CsCl pro mL 10 mM EDTA pH 8.0);

2 mL RNA-Lösung

Austariert wurde mit H₂O (DEPC behandelt!).

Nach Zentrifugation (2h, 50000 Upm, SW 56 Ti-Rotor) hatte sich das RNA-Pellet am Boden des Röhrchens gesammelt. Die CsCl-Phase wurde abpipettiert, das RNA-Pellet mit wenig H₂O (ca. 1 mL) in ein 10 mL Röhrchen gespült und mit 2.5 Volumen EtOH präzipitiert.

cDNA-Synthesen

Synthese nach Huynh et al. 1985

Die Synthese wurde in Anlehnung an das bei Huynh et al. 1985 angegebene Protokoll durchgeführt.

Synthese des ersten Stranges

5 µg Poly(A)mRNA wurden auf 50 µL mit H₂O (DEPC behandelt!) aufgefüllt, für 3 min auf 68°C erhitzt und in Eis abgekühlt.

Dazu wurden pipettiert: 2µL RNasin

50 µL 2x First Strand Mix

5 µL [α^{32} -P]dCTP (3000Ci/mmol)

3 µL (75 U) AMV reverse Transkriptase

Nach einer Inkubation von 2h bei 42°C und 90 sec bei 95°C wurde die Reaktion auf Eis gekühlt.

2x First Strand Mix: 2 mM dNTP, 100 mM Tris-HCl pH 8.5,

80 mM KCl, 0.8 mM DTT,

40 µg/mL Oligo(dT)₁₂₋₁₈

Synthese des zweiten Stranges

Zum Ansatz wurde gegeben: 100 μ L Second Strand Mix
 3 μ L (15 U) Klenow DNA-
 Polymerase

Nach einer Inkubation von 4.5h bei 13°C wurden nochmals 2 μ L (10 U) Klenow DNA-Polymerase zugegeben und für 1.5h bei 13°C weiterinkubiert, bevor die Reaktion mit 10 μ L 0.25 M EDTA und 200 μ L NTE-Puffer gestoppt wurde. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform (s. Maniatis et al. 1982) extrahiert. Zur wässrigen Phase wurden 230 μ L 7 M NH_4 -acetat und 410 μ L Isopropanol gegeben und die cDNA über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentri-fugation gesammelt (13000 Upm, 4°C, 30 min), mit 250 μ L 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (s.o.) und im Vakuum getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50 μ L H_2O aufgenommen und mit 50 μ L 2x First Strand Mix und 2 μ L (50 U) reverser Transkriptase erneut 1h bei 42°C inkubiert.

Second Strand Mix: 100 mM Hepes pH 6.8, 100 mM KCl,
 20 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTP

NTE-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA

S1-Nuklease Behandlung

Ins Reaktionsgefäß pipettieren: 196 μ L S1-Puffer
 5 μ L (20 U) S1-Nuklease

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 μ L 0.25 M EDTA gestoppt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 0.56 Volumen 7 M NH_4 -acetat und 1 Volumen Isopropanol versetzt; die cDNA über Nacht bei -20°C gefällt und wie oben aufgearbeitet.

Methylierung der cDNA

Das DNA-Pellet wurde in 64 μL Methylierungspuffer aufgenommen und dazu wurden pipettiert:

- 8 μL 100 mM DTT
- 8 μL 100 μM S-Adenosyl-Methionin (SAM)
- 6 μL (120 U) *EcoRI* Methylase

Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C und 10 min bei 70°C wurden die überhängenden Enden mit Klenow DNA-Polymerase aufgefüllt.

Methylierungspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA

Verdünnungspuffer für SAM: 10 mM Na-acetat pH 5.2

Auffüllen überhängender Enden

Ins Reaktionsgefäß pipettieren:

- 9 μL 100 mM MgCl_2
- 8 μL H_2O
- 2.5 μL 20 mM dNTP
- 4 μL (20 U) Klenow DNA-PolymeraseI

Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 200 μL NTE-Puffer gestoppt und nach anschließender Phenol/Chloroform Extraktion die wässrige Phase mit 0.56 Volumen 7 M NH_4 -acetat und 1 Volumen Isopropanol versetzt, über Nacht bei -20°C präzipitiert und wie oben zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde die cDNA zur Linkeraddition eingesetzt.

Linker-Phosphorylierung

3 µL (3 µg) *EcoRI*-Linker [12-mer, d(CCGGAATTCCGG)]

3 µL 10x Kinase-Puffer

1 µL [γ^{32} -P]ATP (5000Ci/mMol)

20 µL H₂O

2 µL (20 U) T4 Polynukleotidkinase

Inkubation: 37°C, 60 min

Linkeraddition und EcoRI Hydrolyse

Das cDNA-Präzipitat wurde in 20 µL K/L-Puffer aufgenommen.
Dazu wurden pipettiert:

15 µL phosphorylierter Linker

1 µL (1U) T4 DNA-Ligase

Inkubation: 16°C, 16h

Zur Reaktion wurden 150 µL NTE-Puffer gegeben und nach anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion die Nukleinsäuren mit 0.56 Volumen 7 M NH₄-acetat und 1 Volumen Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Das Präzipitat wurde erneut in 20 µL K/L-Puffer aufgenommen und die Linkeraddition mit weiteren 15 µL phosphorylierten *EcoRI* Linkern wiederholt (s.o.).

K/L-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT,
1 mM ATP

Nach erfolgter Inkubation (16°C, 16h) wurde zum Ansatz (36 µL) gegeben:

4.5 µL 10x *EcoRI* Puffer (Boehringer)

3.5 µL H₂O

1.0 µL (80 U) *EcoRI*

Inkubation: 37°C, 2h, 68°C, 10 min

Anschließend wurde die cDNA über eine Bio-gel A 50m Säule nach Huynh et al. 1985 fraktioniert und die nicht gebundenen Linkerfragmente abgetrennt.

cDNA-Synthese mit dem BRL Synthesis-System

Die Synthese des ersten und zweiten Stranges wurde genau nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Zur Klonierung wurde die cDNA wie folgt vorbereitet:

Methylierung

20 µL (880 ng) cDNA

4 µL 100 µM SAM

4 µL 100 mM DTT

16 µL Methylierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5,
1 mM EDTA)

4 µL (80 U) *EcoRI* Methylase

Inkubation: 30 min, 37°C, 10 min 70°C

Auffüllen überhängender Enden mit T4 DNA Polymerase

Zum Ansatz wurde pipettiert: 1.28 µL 1M Tris-HCl pH 7.5

6 µL 100 mM MgCl₂

1.2 µL 10 mM dNTP

2.4 µL H₂O

1 µL (2 U) T4 DNA-
Polymerase

Inkubation: 30 min 37°C

Nach einer anschließenden Phenol/Chloroform Extraktion wurde die cDNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-acetat pH 6.0 und 3 Volumen Ethanol präzipitiert und in 10 µL H₂O aufgenommen. Die Phosphorylierung der *EcoRI* Linker (3 µg) erfolgte wie bereits angegeben (s.o.).

Linkeraddition

30 µL phosphorylierter *EcoRI* Linker

10 µL (ca 800 ng) cDNA

1 µL 10x Ligasepuffer

2 µL (2 U) T4 DNA-Ligase

Inkubation: 16°C, 16h, 10 min 70°C

10x Ligasepuffer: 300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂,

100 mM DTT, 4 mM ATP

EcoRI Hydrolyse

zum Reaktionsansatz wurde pipettiert:

5 µL 10x *EcoRI* Puffer (Boehringer Mannheim)

1 µL (90 U) *EcoRI*

Inkubation: 3h 37°C

Nach anschließender Phenol/Chloroform Extraktion wurde die cDNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-acetat pH 6.0 und 3 Volumen Ethanol präzipitiert und in 20 µL H₂O aufgenommen.

cDNA-Synthese mit dem Pharmacia Synthesis Kit

Die Synthese wurde genau nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Lediglich die Phosphorylierung der bereits an die cDNA ligierten Adaptoren erfolgte bei 37°C für 3h statt 30 min (Heinrich, pers. Mitteilung).

Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

Agarose-Harnstoff-Gele für RNA

(in Anlehnung an Locker 1979 und Weiß 1989)

Um Kontaminationen mit RNasen zu beseitigen, wurden die verwendeten Glasplatten sowie die Elektrophoresekammer gründlich mit SDS gereinigt; die Lösungen wurden, soweit möglich, mit 0.2% DEPC behandelt oder mit DEPC behandeltem H₂O angesetzt.

Nach Erstarren des für dieses Vertikalgel nötigen Stützgels wurden 10.8 g Harnstoff in 12.6 mL H₂O und 1.4 mL 20 x RNA-Puffer in der Hitze gelöst. Diese Lösung wurde nach Abkühlen auf ca. 40°C in vorbereitete Agarose-Lösung (0.45 g Agarose in 14 mL H₂O kochen) gegossen, gut durchmischt, sofort auf das Stützgel gegossen und über Nacht bei 4°C zum Erstarren gebracht. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 45 µL Formamid-Mix für 10 min auf 75°C erhitzt. Als Laufpuffer diente 1 x RNA-Puffer. Die Auftrennung ist nach einer Laufstrecke für Bromphenolblau von etwa 2/3 der Gellänge zu beenden (ca. 3-4 h, 40 mA, 4°C).

Stützgel: 20 µL 20 x RNA-Puffer

50 µL 10% SDS

750 µL 30%ige Acrylamid-Bis(0.8%)-Lösung

ad 5 mL mit H₂O auffüllen, 1 Spatelspitze Per und

25 µL TEMED zufügen

20 x RNA-Puffer:

800 mM Tris

720 mM NaH₂PO₄

40 mM EDTA

Formamid-Mix:

100% Formamid

0.02% Bromphenolblau

0.02% Xylenxyanol

Agarose-Formaldehyd-Gel für RNA

(In Anlehnung an Lehrbach 1977 und Diersch 1986)

RNase Kontaminationen wurden wie bereits genannt vermieden (s.o.). Für ein ca. 6mm dickes Horizontalgel wurden 1.5 g Agarose in einer Lösung aus 30 mL 5 x Gel-Puffer und 94 mL H₂O aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und mit 27 mL 37%iger Formaldehydlösung versetzt, bevor es gegossen wurde. Die RNA-Probe (max. 9 µL) wurde in 36 µL Probenpuffer (9µL 5 x Gel-Puffer, 7 µL 37%ige Formaldehydlösung, 20 µL Formamid) zur Denaturierung 15 min auf 55°C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 30 mA in 1 x Gel-Puffer.

5 x Gel-Puffer: 0.2 M MOPS pH 7.0
 50 mM Na-acetat
 5 mM EDTA

Agarose-Gelelektrophorese für DNA

(nach Maniatis *et al.* 1982)

Für analytische und präparative Zwecke wurden zur Auftrennung von DNA-Molekülen horizontale Agarose-Gele (0.6-1.2%) verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (0.089 M Tris-Borat, 0.089 M Borsäure, 2 mM EDTA).

Alkalische Gelelektrophorese zur cDNA Analyse

(nach McMaster und Carmichael 1977)

Es wurde ein vertikales 1.4%iges Agarosegel in 1x Gelpuffer gegossen. Die aufzutrennende Probe wurde mit 2 Volumen 2x Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 75V durchgeführt, bis der Farbmarker ca. 10 cm weit gewandert war. Als Laufpuffer diente 1x

Elektrophorese-Puffer. Nach dem Trocknen im Gelrockner wurde das Gel autoradiographiert.

10x Gelpuffer: 0.3 M NaCl
20 mM EDTA pH 7.5

10x Elektrophorese-Puffer: 0.3 M NaOH
20 mM EDTA

2x Auftragspuffer: 20 mM NaOH
20% Glycerin
0.02% Bromphenolblau

Polyacrylamidgelelektrophorese für DNA
(nach Maniatis *et al.* 1982)

Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (100-1000 bp) sowie zur Analyse von cDNA Produkten wurden 7.5%ige vertikale Polyacrylamidgele eingesetzt. Als Laufpuffer diente auch hier 1x TBE-Puffer.

Die Nucleinsäuren können entweder durch Zusatz von Ethidiumbromid (1µg/mL) zur Gellösung oder durch Schwenken des Gels nach der Elektrophorese in Ethidiumbromidlösung (5µg/mL, ca. 30 min) unter UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht und anschließend zur Dokumentation photographiert werden.

ERGEBNISSE

In den Boden als Düngemittel eingebrachtes Cyanamid wird in erster Linie von Mikroorganismen und nicht von anorganischen Katalysatoren zu Harnstoff umgesetzt (Ernst 1967). Der Nachweis und die erste Charakterisierung des für diesen Prozeß verantwortlichen Enzyms - der Cyanamidhydratase (E.C.4.2.1.69) - gelang Stransky und Amberger (1973) aus dem Cellulose-abbauenden Bodenpilz *Myrothecium verrucaria*. Für das Ziel der vorliegenden Arbeit war es notwendig, dieses Enzym in hohen Ausbeuten sehr rein zu gewinnen.

Aktivitätstest für Cyanamidhydratase

Bei diesem Test wird der Cyanamidumsatz dadurch bestimmt, daß im Anschluß an die Inkubation die noch vorhandene Cyanamidmenge über eine Farbreaktion (Steller *et al.* 1965) im Vergleich zu der vorher vorhandenen gemessen wird und zur Inkubationszeit in Beziehung gesetzt wird.

Die Enzymaktivität wurde bei einer Substratkonzentration von 20 mM Cyanamid ermittelt, da die anfangs von Stransky und Amberger (1973) angegebene Cyanamidkonzentration (20 μ M) sich als viel zu gering erwies. Ebenso wurde statt mit 100 μ M Tris-HCl pH 7.5 mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 gearbeitet, da die Enzymaktivität zwischen pH 7.8-8.0 ein Maximum erreicht (Stransky und Amberger 1973)¹.

¹Nach neueren Erkenntnissen läßt sich die Empfindlichkeit des Testes durch Austausch des 10 mM Tris-Puffers gegen 5 mM Na-Phosphat erhöhen (Estermaier 1988).

Im Standardinkubationsansatz (250 μ L Gesamtvolumen) wurden eingesetzt: 5-200 μ L Enzymlösung (je nach Aktivität)

25 μ L 0.2 M Cyanamidlösung

25-220 μ L 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Zur Bestimmung der zu Beginn eingesetzten Cyanamidkonzentration, die bei jedem Aktivitätstest durchgeführt wurde, wurde statt der Enzymlösung 10 mM Tris-HCl pH 8.0 eingesetzt. Während der Inkubationszeit (soweit nicht anders angegeben immer 20 min) betrug die Temperatur konstant 25°C. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 20 μ L des Standardansatzes zum Cyanamidfarbtest eingesetzt.

Die von Stransky und Amberger (1973) postulierte Steigerung der Aktivität (80-140 %) durch Zusatz von 10^{-3} - 10^{-4} M Mangan zum Inkubationsansatz konnte ich nicht bestätigen. Vielmehr wurde bei Zusatz von Mangan (10^{-3} M) ein deutlicher Aktivitätsverlust um bis zu 40% beobachtet (Tab. 1), der allerdings abhängig vom Reinheitsgrad der Präparation war; so beträgt der Aktivitätsverlust im Rohextrakt nur etwa 8%.

Spektralphotometrische Bestimmung von Cyanamid

Mit dem Farbtest (Steller et al. 1965) wurde die Cyanamidmenge gegenüber einem Blindwert ermittelt. Pro Test wurden eingesetzt:

1.3 mL H_2O

2.0 mL 0.2 M Na_2CO_3 Lösung

0.2 mL 0.2 M $Na_2NH_4 [Fe(CN)_5NH_3]$ -Lösung

20 μ L Probelösung bzw. 10 mM Tris-HCl pH 8.0

als Blindwert

Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des gebildeten roten Farbkomplexes im Spektralphotometer bei 530 nm bestimmt. Die Menge des Cyanamids in der Lösung wurde einer Eichgeraden entnommen. Für diese wurden 10 mg Cyanamid in 1L H₂O gelöst und davon 100-1300 µL (100 µL = 1 µg) in den Farbtest statt H₂O (ohne 20 µL Probelösung) eingesetzt. Die Differenz zwischen der Extinktion des Blindwertes und der Probe ergibt die Menge des vom Enzym hydrolysierten Cyanamids.

Tab. 1: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Mangan-
konzentration

Testbedingungen:

Standardinkubationsansatz unter Manganzusatz mit

a) 25 µl Rohextrakt

b) 10 µl durch Gelfiltration an Sephadex G-100
gereinigtem Enzym

	[Mn ²⁺] (mol/l)	Cyanamidverbrauch (µg)
a) Rohextrakt	0	8.1
	10 ⁻⁴	7.5
	10 ⁻³	8.1
	10 ⁻²	7.7
b) Gelfiltration	0	9.9
	10 ⁻⁶	9.9
	10 ⁻⁵	9.9
	10 ⁻⁴	9.8
	10 ⁻³	6.3

Enzymanreicherung

Rohextrakt

(In Anlehnung an Stransky und Amberger 1973)

Zur Gewinnung eines aktiven Rohextraktes wurde das über Nacht bei 4°C aufgetaute Pilzmycel (120-140 g Feuchtwicht) nach Abdekantieren der überstehenden Flüssigkeit in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 suspendiert (pro 10 g Naßgewicht 1-2 mL). Das durch Einsatz eines Messerhomogenisators (Ultraturrax Typ I45, 4°C, 1-2 min) und anschließender Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier B-12, Stellung 6, 5-10X 30 sec bei jeweils 30 sec Pause, unter Eiskühlung) gewonnene Homogenat wurde zentrifugiert (20000 Upm, 4°C, 1h, SS34-Rotor), worauf die Enzymaktivität im Überstand nachgewiesen werden konnte.

Ammoniumsulfatfraktionierung

Die bei einer exakt nach Schleif und Wensink (1981) durchgeführten Ammoniumsulfatfraktionierung (0-30%, 30-60%, 60-90% Sättigung; jeweils 2h mit der entsprechenden Ammoniumsulfatmenge bei 4°C gerührt) erhaltenen Proteinfractionen wurden nach Zentrifugation (15000 Upm, 4°C, 30 min, SS34-Rotor) und anschließender Solubilisierung des gewonnenen Präzipitats in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 auf Cyanamidhydrataseaktivität untersucht. Das Maximum der Enzymaktivität lag in allen Anreicherungen reproduzierbar in der Fällung, die bei 30-60% Sättigung erhalten wird (Tab. 2). Während des Aussalzens wurde der pH-Wert der mit Ammoniumsulfat gesättigten Lösung mit 2 n NaOH auf pH 7.9-8.0 nachgestellt (gegen Glaselektrode gemessen).

Tab.2: Fraktionierung mit Ammoniumsulfat
Ausgegangen wurde von 120g Pilzmycel (Naßgewicht)
Der Aktivitätstest entsprach den Standardbedingungen
Der Proteinanteil wurde nach Lowry-Lopez (Jaenicke 1966) bestimmt

Fraktionen	Volumen [ml]	Aktivität [µkat/ml]	Gesamtaktivität [µkat]	%	Protein [mg/ml]	spez. Aktivität [µkat/µg]
Rohextrakt	105	0.32	34.1	100	3180	10.2×10^{-5}
Ammonium- sulfatfällung 0 - 30%	6.3	0.08	0.5	1.6	9340	0.9×10^{-5}
30 - 60%	8.7	1.99	17.3	52	15920	12.5×10^{-5}
60 - 90%	5.4	0.05	0.3	0.8	8570	0.6×10^{-5}

Gelfiltration

Sephadex G-100

Eine präparative Glassäule (95x3 cm, Biorad) wurde mit dem in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 vorgequollenen (5h, 80°C) Molekularsieb Sephadex G-100 gefüllt und über Nacht mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 bei 4°C equilibriert (Flußrate: 10 mL/h). Nach Auftragen von 9 - 12 mL des aktiven gelösten Ammoniumsulfatpräzipitats (30-60% Sättigung) wurde mit insgesamt ca. 250 mL 10 mM Tris-HCl pH 8.0 eluiert (Fig. 10).

Superose™ 6 HR10/30 und Superose™ 12 HR10/30

Die im Cyanamidhydratase-Aktivitätstest aktivsten Fraktionen der Sephadex G-100 Chromatographie (Fraktionen 70-82, Fig. 10) wurden vereinigt und zur Konzentrierung der darin enthaltenen Proteine mit Ammoniumsulfat (bis 65% Sättigung) gefällt. Von dem in 1.2 - 2 mL 10 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgelösten Präzipitat wurden je 300 µL (max. 5 mg Proteingehalt) auf eine Superose™ 6 HR10/30 Säule (Pharmacia), die mit einer HPLC-Anlage (LKB) betrieben wurde, aufgetragen und mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 eluiert (Fig. 11). Bei Aktivitätstests der Fraktionen wurden bis zu 98 % der eingesetzten Gesamtaktivität im Proteingipfel wiedergefunden; 60-70% an Gesamtprotein wird abgetrennt. Nach mehrmaligem Benutzen der Superose™ 6 Säule war trotz intensiv durchgeführter Waschvorgänge (nach Anleitung des Herstellers) für konstanten Durchfluß eine kontinuierliche Drucksteigerung bei gleicher Flußrate zu beobachten. Da eine Senkung der Flußrate wegen des damit erhöhten Zeitaufwands ungünstig war, wurde auf eine Superose™ 12 HR10/30 Säule (Pharmacia) zurückgegriffen, die anders als die Superose™ 6 Säule nicht nur bis 15 bar, sondern bis 30 bar Gegendruck betrieben werden kann. Das hier erhaltene

Elutionsprofil (Fig. 12) unterscheidet sich ebenso wie die Lage des Aktivitätsmaximums nur unwesentlich von dem der Superose™ 6 Säule.

Eine Übersicht über die gesamte Anreicherung gibt Tab. 3.

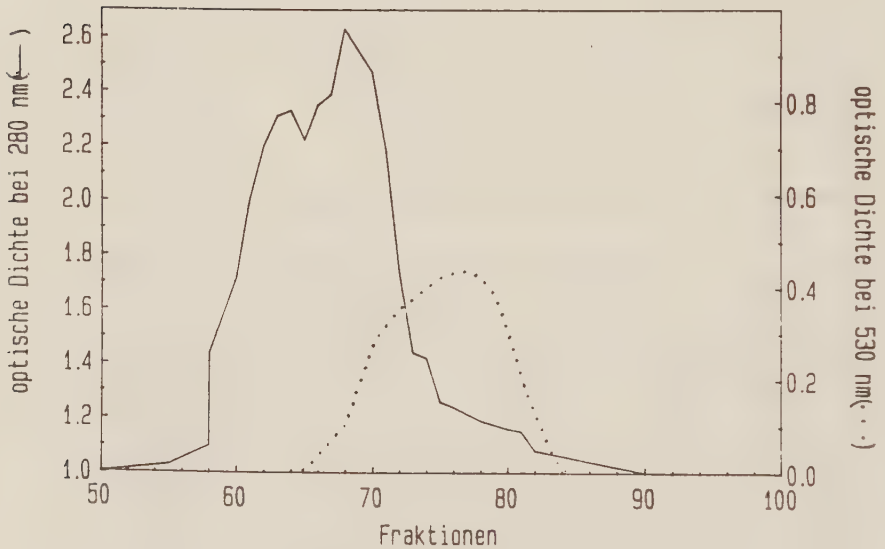


Fig. 10: Elutionsprofil der Cyanamidhydratase bei der Gelfiltration an Sephadex G-100 (95x3 cm)

Fraktionsvolumen: 2 mL

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Flußrate: ca. 10 mL/h

Temperatur: 4°C

Auftragsvolumen: 9 mL, 30-60% Ammoniumsulfatsättigung

Inkubationszeit im Aktivitätstest: 20 min

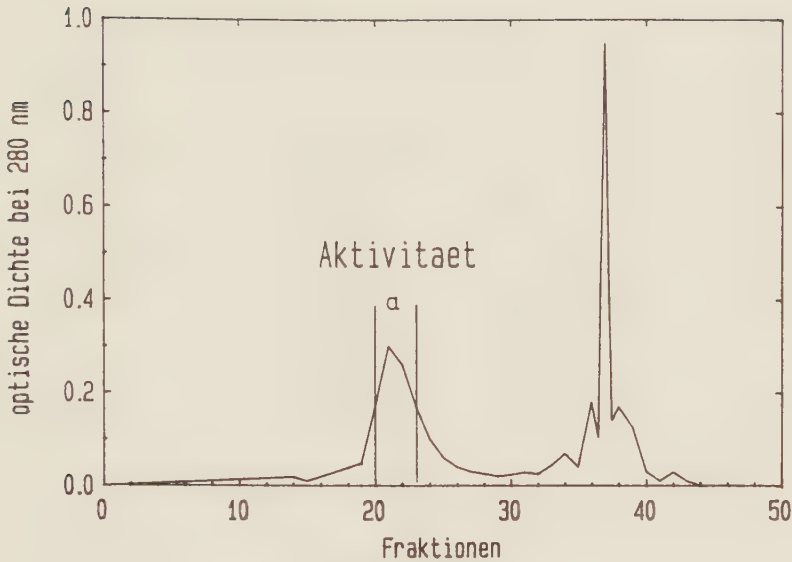


Fig. 11: Elutionsprofil der Gelfiltration an SuperoseTM 6 HR10/30

Auftragsvolumen: 300 µL
 Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0
 Flußrate: 0.5 ml/min, 9-12 bar
 Temperatur: 25°C
 Fraktionsvolumen: 0.5 mL
 Standardaktivitätstest: 20 min Inkubationszeit
 a: Fraktion 20-23 werden vereinigt

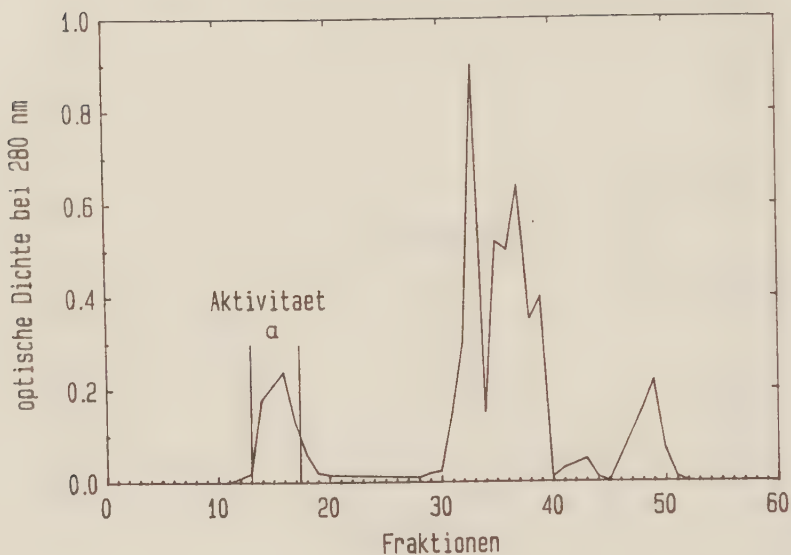


Fig. 12: Elutionsprofil der Gelfiltration an Superose™
12HR10/30

Auftragsvolumen: 300 µL
 Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0
 Flußrate: 0.5 ml/min, 9-12 bar
 Temperatur: 25°C
 Fraktionsvolumen: 0.5 mL
 Standardaktivitätstest: 20 min Inkubationszeit
 a: Fraktion 13-17 werden vereinigt

Tab. 3: Cyanamidhydratase Anreicherung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry-Lopez bzw. Warburg (Jaenicke 1966) bestimmt. Der Aktivitätstest entsprach den Standardbedingungen.

Fraktionen	Volumen [mL]	µkat/mL	Gesamtaktivität		Protein [µg/mL]	spez. Aktivität [µkat/µg]
			[µkat]	%		
Rohextrakt	96	0.41	39.4	100	3750	10.9×10^{-5}
Ammoniumsulfatsättigung 30-60%	9	2.09	18.9	48	16400	12.7×10^{-5}
Gelfiltrat Sephadex G-100	35	0.37	13.0	33	1890	19.6×10^{-5}
Gelfiltrat konzentriert	2.5	4.40	11.0	28	21168	20.8×10^{-5}
Gelfiltrat Superose™ 6	4	1.67	6.7	17	1375	121.4×10^{-5}

Anmerkungen

Rohextrakt

Im Gegensatz zu der bei Stransky und Amberger (1973) beschriebenen Anreicherung - er verwendete McIlvaine Puffer pH 6.0 (63.2 % Dinatriumhydrogenphosphat / 36.8 % Citronensäure (Rauen 1956)) - wurde das Pilzmycel in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 suspendiert, da die Enzymaktivität bei pH 7.7 - 8.0 ein Maximum besitzt (Stransky und Amberger 1973). Die im Rohextrakt gemessene Enzymaktivität war deshalb um 40% höher.

Ammoniumsulfatfraktionierung

Änderungen der Fraktionierungsstufen (0-20%, 20-40%, 40-60%; 30-50%, 50-70% Sättigung) führten stets zu einer Aktivitätsverteilung über mehrere Fraktionen. Wurde die Ammoniumsulfatfällung bei 30-60% Sättigung über einen längeren Zeitraum (4h, 6h oder über Nacht) durchgeführt, hatte dies stets einen Verlust an Aktivität zur Folge; bei einer Fällung kürzer als 2h verblieb nach der Zentrifugation zuviel Aktivität im Überstand. Als wichtig erwies sich nach Zugabe des Ammoniumsulfats die Anhebung des pH-Werts der Lösung mit 2n NaOH auf pH 7.9-8.0. Durch diese Maßnahme sowie auch durch das Suspendieren des Pilzmycels in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 konnte die Aktivität der Ammoniumsulfatfraktionen gegenüber dem Arbeiten bei pH 6.0 um das 3 bis 4fache gesteigert werden (ohne Beleg). Das bei Stransky und Amberger (1973) gefundene Maximum der Enzymaktivität in der Fraktion mit 70-90% Sättigung konnte nicht reproduziert werden.

Nicht befriedigend ist der bei der Fällung auftretende hohe Verlust an Gesamtaktivität (Tab. 3), der auf eine extrem große Salzempfindlichkeit der Cyanamidhydratase hindeutet. Da jedoch im präparativen Maßstab² gearbeitet werden mußte, wurde der Verlust aus Zeitgründen toleriert.

Gelfiltration

Aus Vorversuchen ging eindeutig hervor, daß eine weitere Aufreinigung der aktiven Fraktionen über Ionenaustauscher auf Grund der Bindungseigenschaften der Cyanamidhydratase nicht möglich ist (Obermaier 1984). So waren Kationenaustauscher nicht in der Lage, das Enzym zu adsorbieren; von allen getesteten Anionenaustauschern war lediglich an DEAE-Sephadex A25 (Pharmacia) eine Bindung zu erreichen. Es ließ sich allerdings kein aktives Enzym eluieren (weniger als 1%). Dies ist wohl auf die Instabilität der Cyanamidhydratase bei höheren Salzkonzentrationen zurückzuführen (Obermaier 1984, Estermaier 1988). Auch die Dialyse des Eluats zur Erniedrigung des Salzgehalts gegen 10 mM Tris-HCl pH 8.0 lieferte keine befriedigenden Ergebnisse, da bei diesem Verfahren das Enzym offensichtlich inaktiviert wird.

Deshalb wurde nach der Chromatographie an Sephadex G-100 direkt eine weitere Gelfiltration an einer hochauflösenden Superose Säule (Pharmacia) durchgeführt, für welche die vorher beschriebene Konzentrierung mit Ammoniumsulfat auf Grund des geringen Säulenauftragsvolumens (max. 300 µL) nötig war.³ Auffallend bei der zweiten Ammoniumsulfatfällung ist hier der im Vergleich zur Präzipitation des Rohextraktes deutlich geringere Aktivitätsverlust (Tab. 3),

²Bei in analytischem Maßstab durchgeführten Enzympräparationen wurde der Rohextrakt direkt auf eine Sephadex G-200 Säule aufgetragen. Der Verlust an Gesamtaktivität beträgt hier nur 16% (Estermaier 1988).

³Die inzwischen erhältliche präparative SuperoseTM12 Säule ermöglicht es, die durch Ammoniumsulfat konzentrierte Probe in einem Säulenlauf aufzutrennen (Maier, in Vorbereitung).

der vielleicht auf den höheren Reinheitsgrad (z.B. durch Entfernung von Proteasen) der Cyanamidhydratase zurückzuführen ist.

Stabilität der Cyanamidhydratase

Nach der Gelfiltration an Superose™ 6 bzw. Superose™ 12 konnten die aktiven Fraktionen über einen Zeitraum von 6 Wochen ohne nennenswerten Aktivitätsverlust bei -20°C unter Zusatz von 25% Glycerin aufbewahrt werden. Bis zu diesem Reinigungsschritt mußte die Anreicherung ohne Unterbrechung durchgeführt werden, da sonst die Aktivität bedingt durch Proteolyse (Auftreten mehrerer Banden im SDS-Gel) schnell verloren ging.

Hydrophobe Chromatographie

Während dieser Arbeit stand für kurze Zeit eine neuentwickelte HIC (hydrophobic interaction chromatography)-HPLC Säule (Ultropac TSK-Phenyl 5PW, 7.5x75 mm, LKB) zur Erprobung ihrer Trenneigenschaften zur Verfügung. Diese Säule arbeitet nach dem Prinzip der hydrophoben Chromatographie, d.h. der Ausnutzung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial (an einer Silicat-Matrix immobilisierte Phenylgruppen) und den Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins. Gegenüber der in etwa vergleichbaren "Reversed Phase" Chromatographie bietet sie den Vorteil, ohne jegliches organische Eluens auszukommen.

Zur Auftrennung wurde die aktivste Fraktion einer Gelfiltration an Superose™ 6 HR10/30 auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 0.5 M eingestellt, auf die HIC Säule gegeben und mit einem fallenden Salzgradienten (1.5 - 0 M Ammoniumsulfat, pH 8.0) eluiert. Das Elutionsprofil (Fig. 13) zeigt eine weitere Abtrennung

inaktiven Proteins. Die deutliche Steigerung der spez. Aktivität (Tab. 4) ermutigte zu weiteren Versuchen (Estermaier 1988, Maier in Vorbereitung), in denen genauere Bedingungen für die hydrophobe Chromatographie der Cyanamidhydratase erstellt werden konnte. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

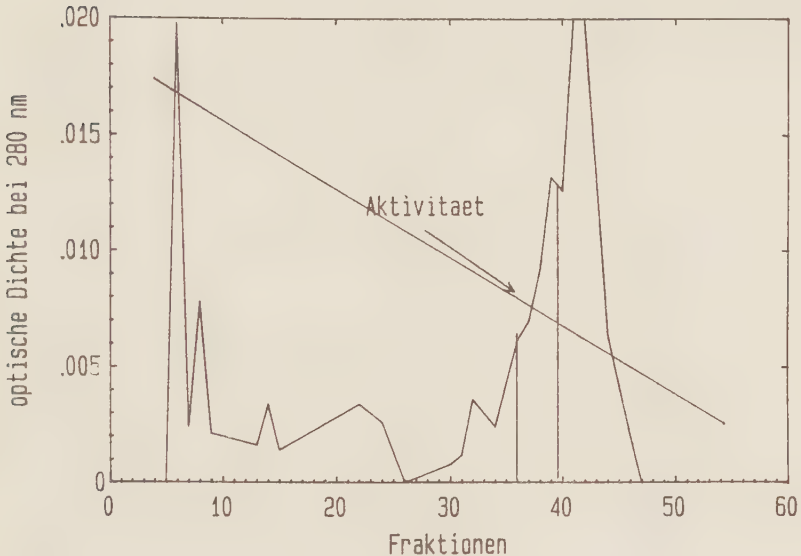


Fig. 13: Elutionsprofil der hydrophoben Chromatographie an der Ultropac TSK Phenyl 5PW Säule

Auftragsvolumen: 1 mL
 Flußrate: 0.3 mL/min
 Fraktionsvolumen: 0.5 mL
 Temperatur: 25°C
 Standardaktivitätstest: Inkubation 3h
 Linearer Salzgradient von 1.5-0M

Tab. 4: Hydrophobe Chromatographie

Der Proteingehalt wurde nach Warburg (Jaenicke 1966) bestimmt.

Fraktionen	Volumen [mL]	Aktivität [μkat/mL]	Gesamtaktivität [μkat]	Protein [mg/mL]	spez. Aktivität [μkat/μg]
Superose™6	1	0.45	0.45	730	61.6×10^{-3}
Phenyl 5 PW	1.5	0.19	0.29	165	117×10^{-3}

Charakterisierung der Cyanamidhydratase

Zeitabhängigkeit der Cyanamidhydratase-Aktivität

Mit einer aktiven Fraktion der Sephadex G-100 Chromatographie wurde die Abhängigkeit der Cyanamidhydrolyse von der Inkubationszeit untersucht. Hierzu wurde aus einem Standardinkubationsansatz im Abstand von 15 min jeweils ein 20 μ L Aliquot entnommen und die darin enthaltene Menge Cyanamid im Farbstest bestimmt. Die Auswertung zeigt eine lineare Abhängigkeit des Cyanamidumsatzes von der Inkubationszeit (Fig. 14).

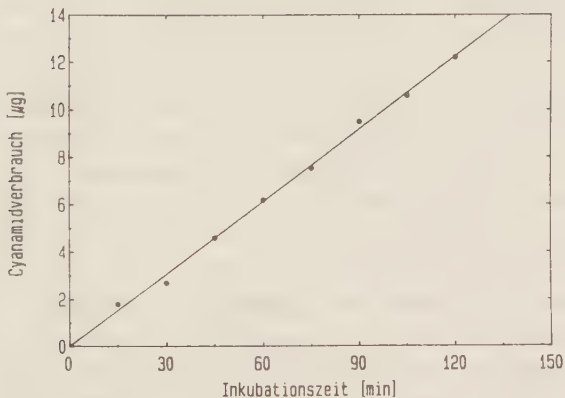


Fig. 14: Zeitabhängigkeit der Cyanamidhydrataseaktivität

Testbedingungen: Standardinkubationsansatz mit 5 μ L einer aktiven Fraktion nach Sephadex G-100 Chromatographie
Temperatur: 25°C

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Mit einer an Phenyl-Superoxe (Estermaier 1988) gereinigten Enzympräparation wurde die Aktivität in Abhängigkeit von der Cyanamidkonzentration bestimmt (Fig. 15). Eine Substratsättigung wurde bei 100 mM Cyanamid erreicht. Aus dem Diagramm nach Lineweaver und Burk (1934) wurde ein K_M -Wert von 27 mM ermittelt (Fig. 16), der um den Faktor 1000 größer als der von Stransky und Amberger (1973) ist.

Temperaturabhängigkeit

Der optimale Wirkungsbereich der Cyanamidhydratase liegt, wie schon bei Stransky und Amberger (1973) beschrieben, zwischen 45°C und 55°C. Dies konnte auch mit dem Enzym, welches nach meiner Methode angereichert wurde, bestätigt werden. Dazu wurde der Standardinkubationsansatz bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, die Proben bei -20°C tiefgefroren und der Farbtest auf Cyanamid mit allen Proben gleichzeitig durchgeführt. Das Aktivitätsmaximum des nach der Gelfiltration an Superose™ 6 HR10/30 eingesetzten Enzyms liegt zwischen 50°C und 55°C (Fig. 17). Da bei dieser Temperatur nahezu das Doppelte an Cyanamid abgebaut wird als bei 25°C (55°C: 7.5 µg; 25°C: 3.8 µg), wird es in Zukunft sicher sinnvoll sein, den Aktivitätstest generell bei einer höheren Temperatur als bisher durchzuführen.

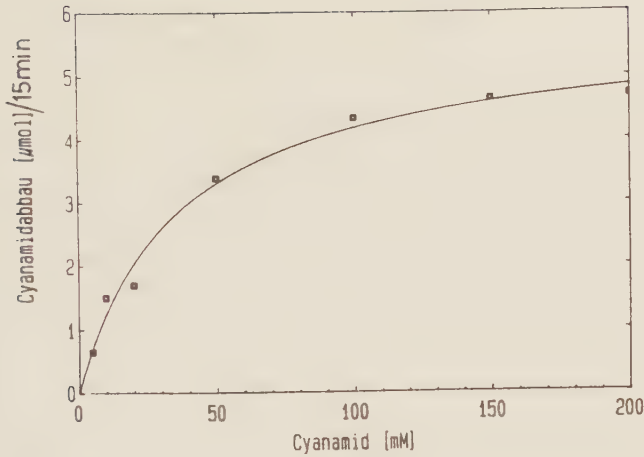


Fig. 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratsättigung

Testbedingungen: Standardbedingungen mit 10 μL Enzymlösung und einer Inkubationszeit von 15 min

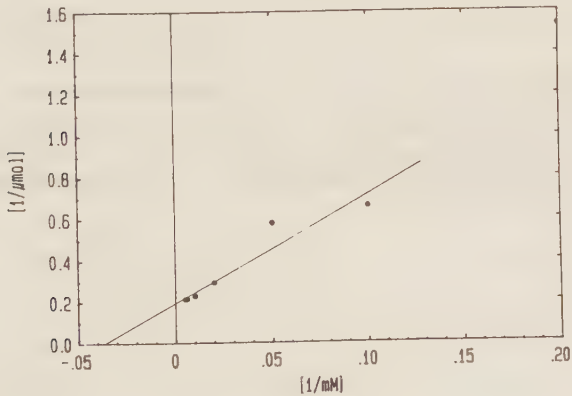


Fig. 16: Substratabhängigkeit der Cyanamidhydratisierungsgeschwindigkeit in der Darstellung nach Lineweaver und Burk (1952)

Meßdaten: $-1/K_M = -0.037$

$K_M = 27 \text{ mM}$

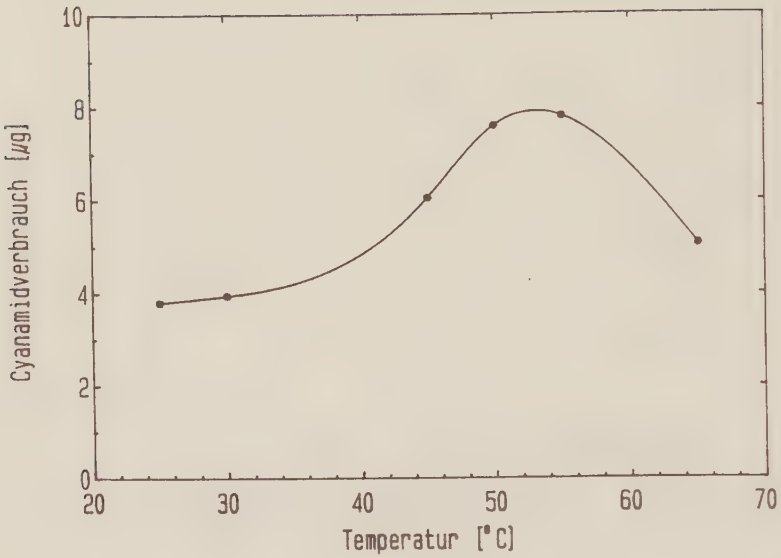


Fig. 17: Temperaturabhängigkeit der Cyanamidhydratase

Der Standardaktivitätstest wurde mit einem Enzym nach der Gelfiltration an Superose™ 6 HR10/30 bei der jeweils angegebenen Temperatur durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 20 min.

Einfluß der Pufferkonzentrationen

Da bereits bekannt war, daß schon eine Salzkonzentration von 0.2 M KCl die Aktivität des Enzyms um nahezu 90% inhibiert (Obermaier 1984), sollten weitere Pufferzusammensetzungen getestet werden, um eine Optimierung der Anreicherung zu erzielen. Der Aktivitätstest wurde unter Standardbedingungen mit einer durch Gelfiltration (Sephadex G-100) gereinigten Enzymlösung durchgeführt. Die Ergebnisse (Tab. 5) zeigen trotz 10fach höherer Salzkonzentration des Phosphatpuffers immerhin noch 79% der Aktivität, die im Standardpuffer ermittelt worden war. Im Phosphatpuffer wirkt sich die Erhöhung der Salzkonzentration nicht so schädlich aus wie im Trispuffer. Daher scheinen weitere Versuche mit verschiedenen Natriumphosphatkonzentrationen sinnvoll.⁴

Tab. 5: Einfluß verschiedener Puffer auf die Enzymaktivität
Standardaktivitätstest mit einer durch Gelfiltration an Sephadex G-100 gereinigten Enzymlösung.

Pufferkonzentration	Aktivität [μ kat/mL]	%
0.01 M Tris-HCl pH 8.0	0.121	100
0.01 M Tris-HCl pH 8.0 + 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.022	17
0.01 M Tris-HCl pH 8.0 + 1.5 M NaCl	0.012	9
0.1 M Na-Phosphat pH 8.0	0.100	79
0.1 M Na-Phosphat + 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.044	35
0.1 M Na-Phosphat + 1.5 M NaCl	0.042	33

⁴Inzwischen hat sich ein 5 mM Phosphatpuffer als optimal sowohl für den Aktivitätstest als auch die Gelfiltration herausgestellt (Estermaier 1988).

Dicyandiamid als Substrat

Es sollte untersucht werden, ob die Cyanamidhydratase auch das Dimere Dicyandiamid zu hydratisieren vermag. Der Standardinkubationsansatz wurde mit 20 mM Dicyandiamid und einer nach der Gelfiltration an Sephadex G-100 aktiven Enzympräparation (0.37 μ kat/mL) durchgeführt. Einer über insgesamt 5h laufenden Versuchsreihe wurden alle 30 min Proben (20 μ L) entnommen, bei -20°C tiefgefroren und der Umsatz an Dicyandiamid mit dem in Methoden geschilderten Farbtest nach Auftauen der Proben bestimmt. Innerhalb der Meßgenauigkeit konnte keine Abnahme der Dicyandiamidkonzentration beobachtet werden. Die maximale Differenz der Meßwerte betrug 0.012 (OD_{540}), was einem aus der Eichkurve ermittelten äußerst geringen Verbrauch von 0.4 μ g Dicyandiamid entspricht (vergleichbarer Cyanamidverbrauch: ca. 10 μ g). Auch die Verlängerung der Inkubationszeit über Nacht sowie die schrittweise Erhöhung der Enzymkonzentration im Test von 25 μ L auf maximal 200 μ L ergab keinen meßbaren Verbrauch an Dicyandiamid. Diese Experimente sprechen dafür, daß das Enzym Cyanamidhydratase das Cyanamid-Dimere Dicyandiamid nicht in meßbaren Mengen umzusetzen vermag und somit von einer hohen Spezifität für das Substrat Cyanamid ausgegangen werden kann.

Aktivität in Gegenwart Cyanamidhydratase-spezifischer Antikörper

Eine aktive Fraktion nach Gelfiltration an SuperoseTM 6 HR10/30 wurde mit Cyanamidhydratase spezifischem Antiserum vorinkubiert und der Standardaktivitätstest im Vergleich zu einer Enzymlösung ohne Antiserum durchgeführt. Die im Serum enthaltenen Antikörper erkennen offensichtlich auch Epitope, die im oder in der Nähe des aktiven Zentrums der Cyanamidhydratase liegen (Tab. 6). Eine weitere Erklärung für den Rückgang der Aktivität wäre eine durch die

Antikörperfixierung hervorgerufene Konformationsänderung des Enzyms.

Tab. 6: Hemmung der Enzymaktivität durch Cyanamidhydratase spezifische Antikörper

Testbedingungen: Standardaktivitätstest mit 25 μ L einer Fraktion der Superose™ 6 HR 10/10 Chromatographie ohne Antiserum und nach Vorinkubation mit 25 μ L Antiserum (2h, 25°C)

	Cyanamidabbau [μ g]	% Aktivität
Enzym ohne Antiserum	13.5	100
Enzym mit Antiserum vorinkubiert	1.7	12

SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Analyse der Enzymanreicherungsschritte wurden Proben der jeweils aktivsten Fraktionen in einem denaturierenden 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli 1970) und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In allen Fraktionen ist eine breite, intensiv gefärbte Bande a mit hoher Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zu sehen (Fig. 18). Spur 9 und 10 zeigen die am besten gereinigte und angereicherte Enzymfraktion der Superose-Chromatographie. Trotz noch sichtbarer Verunreinigungen vor allem im Bereich niedriger Mobilität im SDS-Gel wurde diese Präparation für die Gewinnung von Antikörpern eingesetzt.

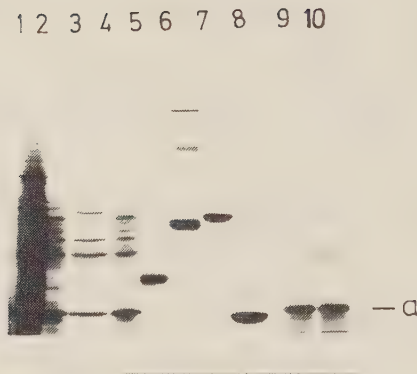


Fig. 18: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der einzelnen Schritte der Enzymanreicherung

Elektrophoresebedingungen: 60 V, über Nacht bei Raumtemperatur

Spur 1: Rohextrakt (400 μ L, gefällt) aufgetragen 30 μ L, (8 μ g)

Spur 2: Ammoniumsulfatfällung 30.60% (40 μ L, 6 μ g)

Spur 3: Gelfiltration an Sephadex G-100 (500 μ L, gefällt, aufgetragen: 30 μ L, 5 μ g)

Spur 4: Gelfiltration an Sephadex G-100 (600 μ L, gefällt, aufgetragen: 50 μ L, 7 μ g)

Spur 5: Lactatdehydrogenase (M_r : 36500), 5 μ g

Spur 6: Glutamatdehydrogenase (M_r : 55400), 5 μ g

Spur 7: Katalase (M_r : 60000), 5 μ g

Spur 8: Chymotrypsinogen A (M_r : 25000), 5 μ g

Spur 9/10: aktivste Fraktionen nach Chromatographie an Superose™ 6 HR10/30 (200 μ L, gefällt, aufgetragen: 30 μ L, 5 μ g)

Identifizierung der Cyanamidhydratase im SDS-Gel

Um zu belegen, daß es sich bei der im SDS-Gel deutlich angereicherten Bande a (Fig. 18) tatsächlich um Cyanamidhydratase handelt, wurden aus unterschiedlichen Bereichen des Gels aufgetrennte Proteine eluiert und die Reassozi-
 ziation zum funktionellen Enzym im Aktivitätstest überprüft.

Dazu wurden die aktiven Fraktionen einer Gelfiltration an Superose™ 12 HR10/30 (s. Methoden) konzentriert und auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden 2 der 10 Bahnen des Gels zur Coomassie-Färbung der Proteine abgetrennt. Die aus dem nicht gefärbten Teil des Gels unter Berücksichtigung des durch das Anfärben bedingten Schrumpfung des Gels ausgeschnittenen Banden a-e (Fig. 18, a-e) wurden mit einem Glasstab so fein wie möglich zerdrückt, mit ca. 500 µL 10 mM Tris-HCl pH 8.0 bedeckt und das Protein 4h bei 4°C eluiert. Nach Zentrifugation (15 min, 12000 Upm, 4°C) konnten je 225 µL dieser Proben zum Aktivitätstest eingesetzt und über Nacht (16h) bei 25°C inkubiert werden. Jede Probe wurde im Cyanamid-Farbstest doppelt bestimmt und die gemessenen Extinktionswerte zur Berechnung gemittelt (Tab. 7). Eine sicher meßbare Abnahme der Extinktionswerte für Cyanamid gegenüber dem Blindwert ohne Enzym ließ sich nur bei der isolierten Zone a feststellen. Geringfügige Aktivität zeigte auch die benachbarte Zone b, ein deutlicher Hinweis auf die Existenz der Cyanamidhydratase in diesem Bereich (a+b). In Zone c und d konnte keine Enzymaktivität bestimmt werden. Eine minimale Aktivität wurde auch in der vollständig isolierten Bahn e gefunden.

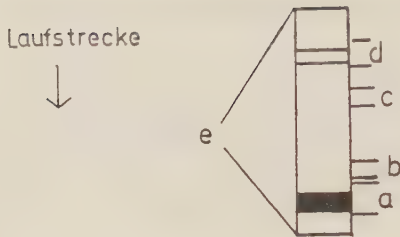


Fig. 19: Schematische Darstellung eines gelelektrophoretischen Analogons einer hoch angereicherten Cyanamidhydratasepräparation (Superose-Fraktion), aufgetrennt auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel (60 V, 16h).

a - e zeigen die für jeweils ein Reassoziationsexperiment isolierten Bereiche.

Tab. 7: Aktivitätstest der aus dem SDS-Polyacrylamidgel eluierten Zonen

Standardbedingungen: Inkubationszeit: 16h
Cyanamidgehalt der Kontrolle: 15.2 µg

Zonen	E 530 nm	Cyanamidverbrauch [µg]
a	0.089	1.76
b	0.036	0.68
c	0.0	-
d	0.0	-
e	0.022	0.42

Bestimmung der relativen Molmasse des dissoziierten Enzyms

Zur Ermittlung der relativen Molmasse der Cyanamidhydratase unter dissoziierenden Bedingungen wurde die elektrophoretische Mobilität des durch Gelfiltration an Sephadex G-100 gereinigten Enzyms im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich zu verschiedenen Markerenzymen bestimmt (Weber und Osborn 1969). Daraus ergibt sich für die Cyanamidhydratase eine relative Molmasse von 28840 ± 1000 (Fig. 18 und 20). Der von Estermaier (1988) angegebene Mittelwert der relativen Molmasse von 30400 bestätigte diesen Befund. In einigen Fällen wurde bei der gelelektrophoretischen Analyse eines Gelfiltrats das zusätzliche Auftreten einer schneller als Chymotrypsinogen A wandernden Bande (Fig. 21 Bande b) beobachtet, ein deutlicher Verlust an Aktivität hingegen war nicht festzustellen. Es könnte sich hier um eine proteolytisch modifizierte Form der Cyanamidhydratase handeln, da die Existenz dieser Bande bevorzugt nach längerer Aufbewahrung des Gelfiltrats nachzuweisen war. Ebenso wurde in durch Ammoniumsulfat konzentrierten Proben das Auftreten einer weiteren Bande (Fig. 21, Bande c) beobachtet, deren Mobilität einem Protein mit der relativen Molmasse von ca. 60000 entspricht. Dieser Befund läßt sich mit der Existenz eines Cyanamidhydratase-Dimers erklären. Beide Hypothesen werden durch die Tatsache erhärtet, daß in Westernblotexperimenten neben der Cyanamidhydratase (Bande a) auch die Banden b und c eine immunologische Kreuzreaktion mit einem für Cyanamidhydratase spezifischen Antiserum zeigen (Fig. 22).

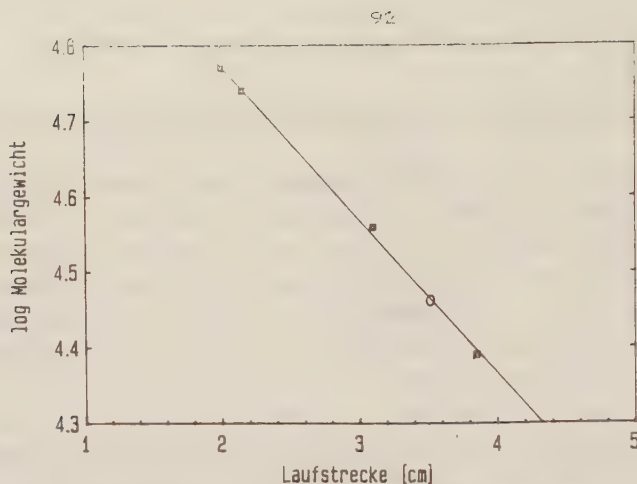


Fig. 20: Bestimmung der relativen Molmasse durch Gelelektrophorese unter dissoziierenden Bedingungen

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

Katalase	(Mr: 60000)
Glutamatdehydrogenase	(Mr: 55400)
Lactatdehydrogenase	(Mr: 36500)
Chymotrypsinogen A	(Mr: 25000)

o: Cyanamidhydratase

60000 — — — c

25000 — = ^a/_b

Fig. 21: Gelelektrophoretische Analyse der aktivsten Fraktionen einer Gelfiltration an Sephadex G-100 nach 1 Woche Lagerzeit

Bedingungen: 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel
50 V, 16h (200 µL gefällt, aufgetragen: 30 µL)

Bande a: Cyanamidhydratase
Bande b: Abbauprodukt der Cyanamidhydratase
Bande c: vermutetes Cyanamidhydratase-Dimer
unter Bande b liegt die Bromphenolblaubande

Induktion der Cyanamidhydratase *in vivo*

Prinzipiell lassen sich Enzyme in konstitutive und induzierbare Enzyme einteilen. Während bei konstitutiven die Konzentration und Bildungsgeschwindigkeit zu jeder Zeit konstant sind, liegen induzierbare Enzyme nur in Spuren vor. Deren Konzentration kann durch Zugabe von Substrat ins Medium rasch auf ein Vielfaches gesteigert werden, besonders dann, wenn das Substrat als alleinige C-, N- oder S-Quelle dient. Um zu zeigen, daß das Enzym Cyanamidhydratase erst durch Zugabe von Cyanamid als alleiniger Stickstoffquelle im Medium induziert wird, wurden die Pilze in Medium mit KNO_3 (10^{-2} M) als Stickstoffquelle gezogen und eine Enzymanreicherung analog der Cyanamid-Pilze einschließlich der Gelfiltration an Sephadex G-100 durchgeführt. Während der Anreicherung wurde auf übereinstimmende Versuchsbedingungen geachtet (gleiche Pilzmenge, gleiche Chromatographiebedingungen, vergleichbare Proteinkonzentrationen bei der Gelelektrophorese). Das Gelfiltrat wurde auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf Nitrocellulose übertragen und in Westernblotexperimenten (s. Methoden) mit dem Gelfiltrat von Cyanamidpilzen verglichen. Die densitometrische Auswertung der Autoradiographie des mit $[^{125}\text{J}]$ Protein A entwickelten Westernblots zeigt deutlich die Induktion der Cyanamidhydratase-Synthese (Fig. 22, Spur 2, Bande a) gegenüber derjenigen der in KNO_3 haltigem Medium gezüchteten Pilze (Fig. 22, Spur 1, Bande a). Auf die Banden b und c in Fig. 22, Spur 1 ist im nächsten Kapitel eingegangen.

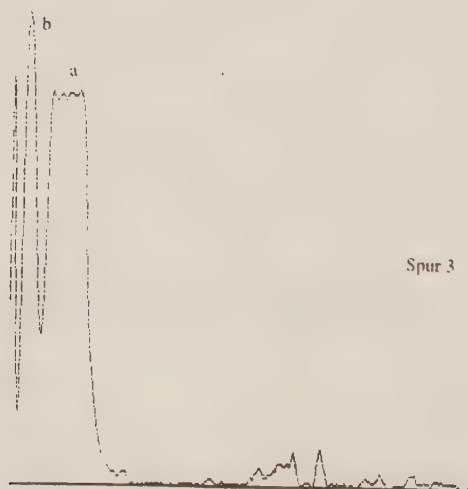
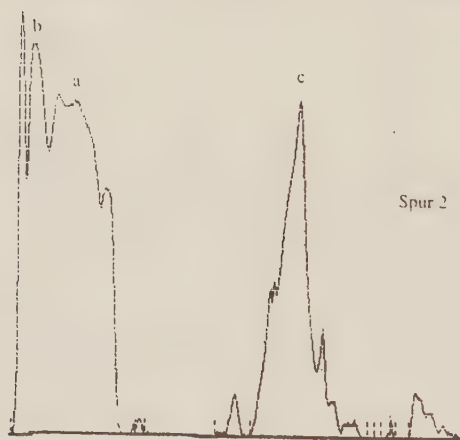
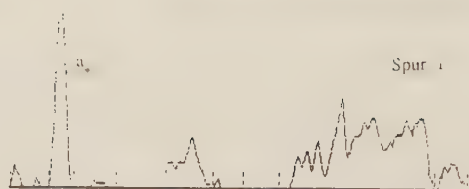


Fig. 22: Densitometrische Auswertung eines Western Blots unter Verwendung der durch Immunoaffinitätschromatographie gereinigten Antikörper

Auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die entsprechenden Gelfiltrate aufgetrennt und in einem Western Blot Experiment analysiert. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit 10 mM Tris-HCl pH 8.0 auf gleiche OD₂₈₀ eingestellt und je 40 µL aufgetragen.

Bande a: Cyanamidhydratase

Bande b: proteolytisches Abbauprodukt der Cyanamidhydratase

Bande c: Cyanamidhydratase-Dimer

Spur 1: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 der in KNO₃ haltigem Medium gezüchteten Pilze

Spur 2: Gelfiltrat nach Sephadex G-100 der in Cyanamid haltigem Medium gezüchteten Pilze

Spur 3: Gelfiltrat nach Superose™ 12 Chromatographie der in Cyanamid haltigem Medium gezüchteten Pilze

Immunreaktion unterschiedlicher Reinigungsstufen der Cyanamidhydratase

Gelfiltrate sowohl nach der Sephadex G-100 als auch der Chromatographie an Superose™ 12 HR10/30 wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem Westernblot wie oben beschrieben analysiert (Fig. 22, Spur 2 und 3). Die nach der Sephadex-Chromatographie gefundenen immunreaktiven Banden a, b und c entsprechen der Cyanamidhydratase (Bande a), dem bereits vermuteten Abbauprodukt (Bande b) sowie einem Protein mit dem Molekulargewicht von 60000, welches einem Cyanamidhydratase-Dimer zugeordnet werden könnte (Bande c). Nach der Gelfiltration an Superose™ 12 HR10/30 ist Bande c mit einer Immunreaktion nicht mehr zu detektieren, wohl aber Bande a und b. Dieser Befund deutet darauf hin, daß das Proteolyseprodukt noch zum multimeren Enzym aggregieren kann.

RNA

Ein Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung einer Genbank von *Myrothecium verrucaria*, welche später ein Absuchen bezüglich des Gens für Cyanamidhydratase ermöglichen sollte. Da das Genom des zu den niederen Eukaryoten zählenden Myceten ebenso wie die DNA höherer Organismen einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an Introns (nicht kodierende Sequenzen) enthalten kann, erschien es vorteilhaft, eine sog. cDNA-Genbank anzulegen, deren Sequenzinformation auf der prozessierten mRNA der Pilze beruht.

RNA-Isolierung

Für die Isolierung von mRNA sind in der Literatur unterschiedliche Methoden beschrieben, so z. B. die Isolierung über Polysomen (Gough und Adams 1978; Kraus und Rosenberg 1982), der Aufschluß der Zellen mit Guanidiniumthiocyanat (Chirgwin *et al.* 1979, Kamiryo und Okazaki 1984) oder die Extraktion der Zellen mit Phenol. Von diesen drei Methoden ist für RNA Isolierungen aus Pilz- und Pflanzenzellen besonders die Phenolextraktion in Gegenwart von Detergenzien geeignet (Slater 1984), wie sie schon für *Neurospora crassa* erfolgreich durchgeführt wurde (Michel *et al.* 1979, Tropschug pers. Mitteilung).

Aufschlüsse aus sofort nach der Ernte tiefgefrorenem (-160°C , fl. N_2) Pilzmaterial führten nur zu nicht translatierbarer mRNA, weshalb für jeden Ansatz die Pilze frisch angezogen wurden (s. Methoden).

Zur Vermeidung exogener RNase-Kontaminationen wurden alle Lösungen frisch angesetzt und ebenso wie alle verwendeten Geräte und Glaswaren so weit möglich mit dem RNase

Inaktivator Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Da diese Verbindung ebenso, wenn auch verzögert, mit Adeninresten von RNA reagiert, ist eine vollständige Entfernung durch Autoklavieren (DEPC zerfällt in CO_2 und EtOH) äußerst wichtig (Blumberg 1987).

Isolierung von Gesamt-RNA

In Gegenwart des Detergens Triisopropylnaphtalinsulfonat wurden die Zellen (ca. 90 g Naßgewicht) homogenisiert und die Proteine durch Zugabe von Phenol denaturiert. Aus der wässrigen Phase nach der Phenolextraktion wurde die Gesamt-RNA mit Ethanol präzipitiert. Da im weiteren Verlauf der Isolierung stets Probleme (schlechte Löslichkeit der RNA, Verstopfen der Oligo(dT)-Säule....) auftraten, die auf eine noch relativ starke Verunreinigung der RNA mit Proteinen hindeuteten, wurde nochmals eine Phenolextraktion, diesmal bei 60°C, angeschlossen (Heinrich, pers. Mitteilung). Das Präzipitat dieses Reinigungsschrittes enthielt noch Verunreinigungen an DNA, restlichen Proteinen und kleinen RNA Molekülen (Fig. 23, Spur 1). Die typische Ausbeute bewegte sich ausgehend von einer 8 L Pilzkultur, im Bereich von 8.6-9.5 mg Gesamt-RNA (OD_{260} Messung).

Obwohl es durchaus möglich war, diese RNA bereits für die Anreicherung von Poly(A)mRNA einzusetzen, dauerte die Durchführung auf Grund des offensichtlich noch hohen DNA Gehalts der Präparation oft 8-10 h, eine zu lange Zeit, um aktive Poly(A)mRNA zu isolieren. Die Abtrennung kontaminierender DNA sowie noch vorhandener Proteinreste gelang mittels kleiner Anionenaustauschersäulen (Qiagen-Säulen, Qiagen Düsseldorf).

Durch ein sauberes Nukleinsäure-Spektrum mit einem Extinktions-maximum zwischen 255 und 260 nm sowie einem Verhältnis von $\text{OD}_{260/280} > 2.0$ konnte die Reinheit der Nukleinsäuren im Eluat belegt werden. Diese wurde ebenso in einem Agarose-Formaldehyd-Gel überprüft (Fig. 23 Spur 2). Die gleichmäßig auftretenden scharfen 28S und 18S

ribosomalen RNA-Banden sowie eine einheitliche Größenverteilung der mRNA lassen auf eine intakte, nicht abgebaute RNA-Präparation schließen. Kleine RNA-Moleküle und DNA-Reste konnten erfolgreich abgetrennt werden. Die typische Ausbeute betrug ca. 3.8 mg an Gesamt-RNA aus 8L Zellkultur.

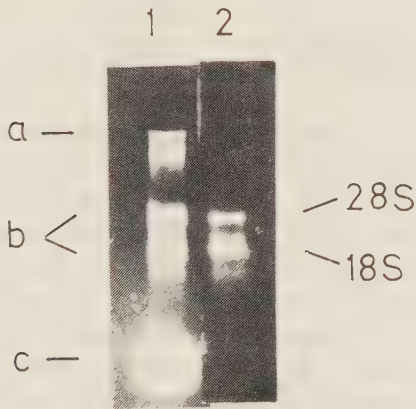


Fig. 23: Gelelektrophoretische Analyse der RNA-Präparation

Spur 1: Gesamt-RNA nach Extraktion mit heißem Phenol (6 µg)

Spur 2: RNA nach der Reinigung über Qiagen - Anionenaustauscher-Säule (4 µg)

Die Auftrennung erfolgte auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel (20 mA, 16h).

Bande a: DNA

Bande b: rRNA (18S, 28S) und m-RNA

Bande c: kl. RNA-Moleküle

Als Alternative dazu wurde eine Reinigung über eine CsCl-Gradientenzentrifugation versucht (Aruffo und Seed 1987). Die Ausbeute an Gesamt-RNA mit 30% (der eingesetzten Nucleinsäuren) war gegenüber den Qiagen-Säulen (45%) etwas geringer. Auch wurden noch geringfügige Verunreinigungen mit DNA beobachtet (ohne Beleg). Trotzdem konnte die anschließende Chromatographie an Oligod(T)-Cellulose erfolgreich durchgeführt werden.

Anreicherung von Poly(A)mRNA

(In Anlehnung an Maniatis *et al.* 1982 und Slater 1984)

Eukaryotische Poly(A)mRNA trägt am 3' Ende 50-200 Adenosin-Reste, weshalb sie leicht durch Chromatographie über eine Oligo(dT)-Cellulose-Säule (bis zu 20 Nukleotide) von tRNA und rRNA abgetrennt werden kann (Aviv und Leder 1972). Die isolierte Gesamt-RNA wird bei hohen Salzkonzentrationen (0.5 M) auf die Oligo(dT) Säule aufgetragen, wobei Poly(A)mRNA über Wasserstoffbrückenbindungen an das Säulenmaterial bindet, nicht polyadenylierte RNA hingegen aus der Säule ausgewaschen wird. Durch Herabsetzung der Salzkonzentration wird das dT:rA Hybrid wieder destabilisiert und so Poly(A)mRNA eluiert.

Zur Konzentrationsbestimmung der Poly(A)mRNA wurde ein Tüpfeltest im Vergleich zu einer tRNA Standardreihe (100 ng-1 µg) durchgeführt. Aus 1 mg Gesamt-RNA konnten zwischen 9-15 µg Poly(A)mRNA gewonnen werden. Eine Überprüfung der Reinheit der Präparation war in einem Agarose-Formaldehyd-Gel möglich (Fig. 24). Der für ein RNA-Gel scharf begrenzte, fluoreszierende Nukleinsäurebereich läßt auf intakte RNA ohne Degradation schließen (sonst wäre ein langer verwischter Bereich mit starker Anreicherung bei kleinen Längen zu sehen, Gookin 1984). Die kaum sichtbare, geringe Kontamination mit rRNA hat auf die Translation keinen Einfluß.

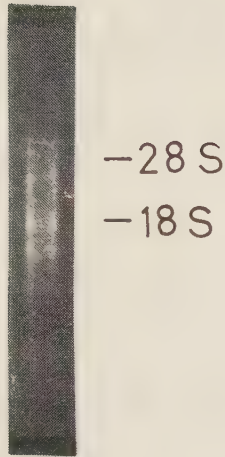


Fig. 24: Gelelektrophoretische Analyse von Poly(A)mRNA

Auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel wurden 2 μ g Poly(A)RNA elektrophoretisch aufgetrennt (40 mA, 13h).

Die genaue Durchführung der Isolierung der Gesamt-RNA und Poly(A)-Anreicherung ist im Methodenteil ausführlich beschrieben. Einige bemerkenswerte Punkte zur Poly(A)-Anreicherung seien noch erwähnt:

Es erwies sich als vorteilhaft, nicht mehr als 100 mg Cellulose für einen Säulenlauf (max. 1mg RNA) einzusetzen, damit die Chromatographie in einem vernünftigen Zeitraum (ca. 2.5-3h) ohne Verstopfen der Säule (auch bedingt durch ein Zusammensacken des Gelbetts auf Grund zu großen Drucks für das sehr empfindliche Säulenmaterial) beendet werden konnte. Auch vermindert sich dadurch das Elutionsvolumen, woraus Poly(A)mRNA in größeren Ausbeuten präzipitiert werden kann. Bis zu drei Oligod(T)-Säulen wurden nebeneinander betrieben.

Auf mehrmalige Chromatographiezyklen, um evtl. Reste an Poly(A)RNA[~] (rRNA) abzutrennen, wurde verzichtet, da dies zu einem Verlust an Poly(A)mRNA führt und gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit RNasen erhöht. Durch Ultrazentrifugation (50000 Upm, 30 min, SWTi56 Rotor) der präzipitierten Poly(A)mRNA konnte die Ausbeute gegenüber einer 40minutigen Zentrifugation bei 15000 Upm (Sigma-Rotor) gesteigert werden.

Die Ausbeuten an Poly(A)mRNA schwanken je nach verwendeter Oligo(dT)-Cellulose, eingesetzter Gesamt-RNA und Chromatographiezyklen zwischen 1 bis max. 4% bezogen auf Gesamt RNA. Sie sind niemals quantitativ (max. 5% der Gesamt-RNA ist Poly(A)-RNA), vermutlich auf Grund der Heterogenität der Poly(A)-Segmente, die gelegentlich recht kurz sein können (Winnacker 1984). Die in dieser Arbeit gefundene Ausbeute von 1-1.5% liegt also im üblichen Rahmen.

Die Bildung des relativ unlöslichen Na-Salzes von SDS beeinflusste die Flußgeschwindigkeit der Cellulose-Säule ebenfalls negativ. Durch Ersatz von NaCl (Slater 1984) durch LiCl (Kingston 1987) konnte dieses Problem bei mir weitgehend gelöst werden.

Es wurde auch versucht, größere RNA-Mengen im sog. batch-Verfahren (Maniatis et al. 1982) aufzuarbeiten. Doch konnte hier Poly(A)freie RNA trotz häufiger Waschvorgänge mit anschließender Zentrifugation (2000 Upm, 5 min, 20°C, SS-34 Rotor) nicht vollständig entfernt werden, so daß die

erhaltene Poly(A)mRNA zu stark verunreinigt und sehr schlecht löslich war.

Die Isolierung von Poly(A)mRNA mit Hilfe der Affinitäts-papier-Chromatographie (Hybond-mAp, Amersham) nach Werner *et al.* 1984 ergab nur eine Ausbeute von 2-3 µg Poly(A)mRNA pro mg Gesamt-RNA und wurde deshalb nicht weiter optimiert.

Charakterisierung der Poly(A)mRNA

Das entscheidende Kriterium für die Funktionalität der Poly(A)mRNA ist ihre Eigenschaft, in Proteine translatiert werden zu können. Die *in vitro* Translation wird in einem zellfreien Weizenkeim- (Davies *et al.* 1977) oder Reticulozytenlysats-System (Pelham und Jackson 1976) durchgeführt, das alle für die Proteinbiosynthese nötigen Komponenten enthält. Stehen für das gesuchte Protein spezifische Immunglobuline zur Verfügung, sollte dieses Protein aus dem Translationsansatz präzipitiert werden können, sofern mit der Poly(A)mRNA Präparation auch die für dieses Protein verantwortliche mRNA erfasst worden ist.

Außerdem kann mit geeigneten DNA-Proben durch Hybridisierung (Thomas 1980) gegen die isolierte Poly(A)mRNA die Existenz der gewünschten Poly(A)mRNA belegt werden.

In vitro Translation und Immunpräzipitation

Ein Aliquot aus der isolierten Poly(A)mRNA wurde unter Einsatz eines Kaninchen-Reticulozytenlysats (Amersham N90) *in vitro* translatiert und die Translationsprodukte, die durch Zusatz von [³⁵S]-Methionin zum Lysat radioaktiv markiert waren, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographiert (Fig. 25). Als Kontrolle diente eine Probe, der statt Poly(A)mRNA die gleiche Menge H₂O zugesetzt wurde.

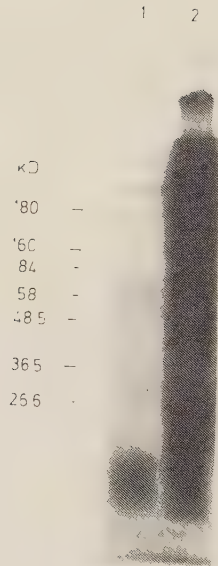


Fig. 25: *In vitro* Translation der Poly(A)mRNA aus *M. verrucaria*

Die angegebene Menge Poly(A)mRNA wurde mit 14 μL Reticulozytenlysat (Amersham N90) und 3 μL (45 μCi) [^{35}S]-Methionin 90 min bei 30°C inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad wurde ein 5 μL Aliquot mit 20 μL Lämmli-Puffer 2 min gekocht und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (s. Methoden) aufgetrennt. Nach dem Trocknen wurde das Gel der Autoradiographie unterzogen.

Spur 1: Kontrolle ohne Poly(A)mRNA

Spur 2: 0.7 μg (2 μL) Poly(A)mRNA pro Ansatz

Bei der Translation wurden Proteine über den gesamten Molekulargewichtsbereich verteilt erhalten, was auf eine intakte Poly(A)mRNA schließen läßt, da stark degradierte mRNAs die Größenverteilung der Reaktionsprodukte in den unteren Molekulargewichtsbereich verschieben würden.

Für die Immunpräzipitation wurde ein Aliquot des Translationsansatzes (15 µL) mit Protein A-Sepharose, welche bereits mit dem für Cyanamidhydratase spezifischen Antiserum abgesättigt war, behandelt (s. Methoden). Die durch dieses Verfahren an den Sepharose-Protein A-Antikörper-Komplex gebundenen Proteine wurden nach Abzentrifugation durch Kochen des Sepharosegels in Lämmli-Puffer freigesetzt und nach Auftrennung auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel autoradiographiert (Fig. 26).

Gegenüber der Kontrolle (Fig. 26 Spur 1) tritt nur eine einzige Bande im Gelmuster auf (Fig. 26 Spur 2), deren Mobilität einer relativen Molmasse von ca. 29000 entspricht. Dies liegt klar im Größenbereich der für Cyanamidhydratase bestimmten relativen Molmasse von 28840 + 1000.

Poly(A)mRNA, die diese Translations- und Immunpräzipitationsergebnisse lieferte, wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt.

Hybridisierung von RNA/DNA-Proben (Northern-Blot)

Gegen Ende dieser Arbeit stand ein kurzes synthetisches DNA-Fragment zur Verfügung, dessen Sequenz

```

5'CAG ATG GAA GCN AAC AC 3'
   A       G       T
3'GTC TAC CTT CGN TTG TG 5'
   T       C       A

```

aus einer Ansequenzierung von Cyanamidhydratasefragmenten ermittelt wurde (Maier, in Vorbereitung).

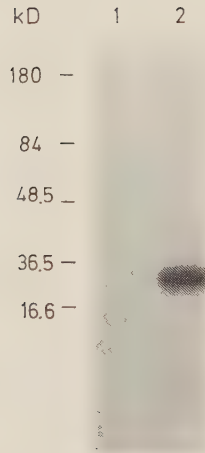


Fig. 26: Immunpräzipitation des Translationsansatzes

Der zur Immunpräzipitation eingesetzte Translationsansatz ist in der Legende zu Fig. 25, die Durchführung in Methoden beschrieben.

Spur 1: Kontrolle, Präzipitation des Translationsansatzes ohne RNA

Spur 2: Präzipitation eines 15 μ L Aliquots des Translationsansatzes mit 0.7 μ g Poly(A)mRNA

Ein mit diesem 17mer Oligonukleotid (auf Grund der 32fachen Degenerierung eigentlich ein Gemisch) durchgeführtes Dot-Blot Experiment zeigt im Vergleich zur Kontrolle mit *E.coli* tRNA ein positives Hybridisierungssignal (Fig. 27). Auch ein mit Hilfe dieses 17mer Oligonukleotids in einer genomischen Genbank von *M. verrucaria* gefundenes Fragment (ca. 1000 bp, Maier 1989, in Vorbereitung) erzeugte bei Hybridisierung gegen eine auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennten Poly(A)mRNA (Northern Blot) eine starke Bande mit einer Größe von ca. 900 Basenpaaren (Fig. 28).

Diese beiden Befunde waren eine weitere Bestätigung dafür, daß die isolierte und für die cDNA-Synthese eingesetzte Poly(A)mRNA RNA-Sequenzen enthält, die offensichtlich für Abschnitte der Cyanamidhydratase kodieren.



Fig. 27: Dot-Blot Hybridisierung

Je 1 µg entsprechender RNA wurde auf ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher und Schüll BA 85) aufgetragen und gegen 100 ng des mit [³²P] markiertem 17mer Oligonukleotids hybridisiert (s. Methoden). Die Waschbedingungen der Membran waren:

2x 15 min 5x SSPE/0.1% SDS, Raumtemperatur
1x 4 h 5x SSPE/0.1% SDS, 30°C

Dot 1: 1 µg Poly(A)mRNA aus *M. verrucaria*
Dot 2: 1 µg *E.coli* tRNA

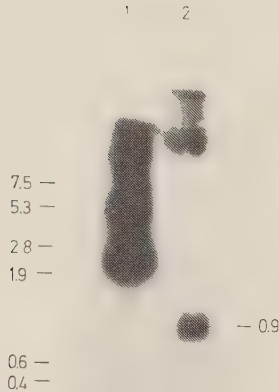


Fig. 28: Northern-Blot

5 µg Poly(A)mRNA von *M. verrucaria* wurden auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Nach der Übertragung der Nukleinsäuren auf eine Membran (Amersham Hybond-C, s. Methoden) erfolgte eine Hybridisierung gegen das 1000 bp genomische DNA-Fragment, das mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markiert war (Random Primed Labelling Kit, Boehringer Mannheim).

Waschbedingungen der Membran:

3x 150 mL 0.1% SDS/1xSSPE, 10 min, Raumtemperatur

2x 150 mL 0.1% SDS/0.25xSSPE, 15 min, Raumtemperatur

Spur 1: Zur Kontrolle der Hybridisierung wurden auf das Gel 2 µg pUC 19 Plasmid-DNA mit dem einklonierten 1000 bp Fragment aufgetragen

Spur 2: 5 µg Poly(A)mRNA aus *M. verrucaria*

cDNA-Genbank von *M. verrucaria*

Die isolierte und charakterisierte Poly(A)mRNA von *M. verrucaria* sollte transkribiert und die so synthetisierte intronfreie cDNA zur Erstellung einer repräsentativen cDNA-Genbank des Bodenpilzes eingesetzt werden. Da aus vorherigen Experimenten ein gereinigtes Kaninchenserum mit polyklonalen, für Cyanamidhydratase spezifischen Immunglobulinen (Gewinnung siehe Methoden) zur Verfügung stand, die als Sonde für ein systematisches Absuchen der Genbank fungieren konnten, wurde als Klonierungsvehikel der Expressionsvektor Lambda-gt11 (Young und Davis 1983a) gewählt. Neben der relativ einfachen Handhabung einer auf diesem Vektor basierenden Phagenbank ist es vor allem die hohe Effizienz der *in vitro* Verpackung von DNA in Phagenköpfe (pro µg eingesetzter mRNA bis zu 10⁸ rekombinante Phagen), die gegenüber einer Klonierung in Plasmide große Vorteile bietet.

cDNA Synthese

In der vorliegenden Arbeit wurden zur cDNA Synthese zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen (Fig. 29b): 1. nach Huynh *et al.* (1985) und 2. nach Gubler und Hoffmann (1983) unter Verwendung von cDNA Synthese-Kits.

Beiden Methoden gemeinsam ist die Verwendung von Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer zur Synthese des ersten Stranges, wobei dessen Komplementarität zum Poly(A)-Schwanz der mRNA ausgenutzt wird. Durch eine RNA-abhängige DNA Polymerase, der sog. reversen Transkriptase, wird nach der Primer-hybridisierung ein mRNA/DNA Hybrid gebildet.

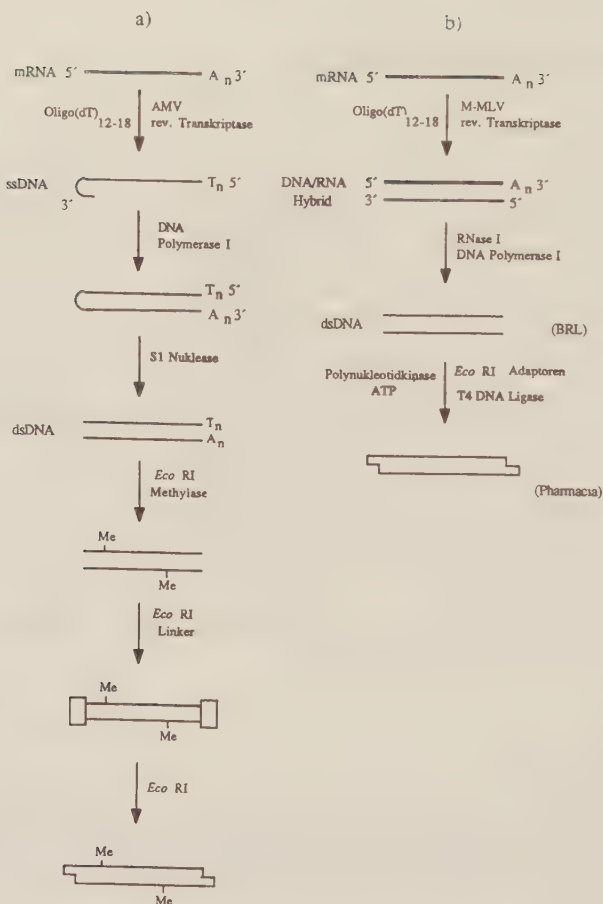


Fig. 29: Verschiedene Wege zur cDNA-Synthese

- a) Synthese nach Huynh *et al.* (1985)
- b) Synthese nach Gubler und Hoffmann (1983) unter Verwendung von Synthese-Kits (Pharmacia, BRL)

Bei der klassischen Synthese des zweiten Stranges (Efstratiadis 1976) wird der kleine "Hairpin" am 3'Ende der einzelsträngigen cDNA von DNA Polymerase I oder reverser Transkriptase als Primer für die Synthese des Komplementärstranges benutzt. Der kurze einzelsträngige cDNA Bereich innerhalb der Schleife muß mit der einzelstrangspezifischen S1 Nuklease geöffnet werden (Huynh et al. 1985).

Im Gegensatz dazu läßt die zweite, erstmals von Okayama und Berg (1982) beschriebene und von Gubler und Hoffmann (1983) weiterentwickelte Methode das RNA/DNA Hybrid intakt. Mit Hilfe von *E. coli* RNase H werden unter milden Bedingungen Strangbrüche (nicks) im mRNA Anteil gesetzt, wobei an der RNA freie OH-Gruppen entstehen, an denen die DNA Polymerase I zur Synthese des zweiten Stranges einsetzt. Die 5'→3' Exonuklease-Aktivität dieses Enzyms fungiert als RNase H Exonuklease (Lehmann 1981) und entfernt die in Syntheserichtung liegenden RNA-Primer sukzessiv. Dieser Weg ist die Basis der inzwischen von vielen Firmen angebotenen Synthese-Kits unterschiedlichster Qualität, von welchen zwei in dieser Arbeit Verwendung fanden.

cDNA Synthese nach Huynh et al. (1985)

Die Synthese wurde, ausgehend von 5 µg Poly(A)mRNA, nach Protokoll (s.Methoden) durchgeführt, wobei jeweils ein Aliquot des Reaktionsansatzes sowohl nach Synthese des ersten Stranges, des zweiten Stranges als auch nach der auf Grund der "Hairpin" Bildung nötigen S1 Nuklease Behandlung entnommen und auf einem 7.5 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurde. Da die Synthese unter Zusatz von [α - 32 P]dCTP vorgenommen wurde, konnte nach Trocknung des Geles und anschließender Autoradiographie ein Transkript der Länge von 1600 bp nachgewiesen werden (Fig. 30), das bei quantitativer Abschätzung auf eine Ausbeute von etwa 400-650 ng cDNA hindeutete.

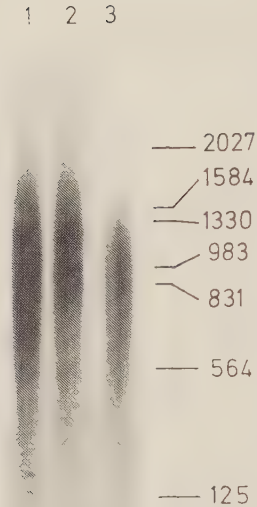


Fig. 30: Größenverteilung der cDNA Synthese nach Huynh *et al.* (1985)

Ein 5 μ L Aliquot der Synthese des 1. Stranges (Spur 1), des 2. Stranges (Spur 2) und nach der S1-Nuklease Behandlung (Spur 3) wurde auf einem 7.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (6h, 100V) und nach dem Trocknen autoradiographiert. Als Größenmarker ist am linken Rand eine mit *EcoRI/HindIII* hydrolisierte Lambda-DNA angegeben.

Im weiteren Verlauf wurde die cDNA mit *EcoRI* Methylase methyliert, mit Klenow Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt, woran synthetische, nach Phosphorylierung mit [$-^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markierte Linker (12-mer, d(AATTCGGAATT), Boehringer Mannheim) ligiert werden konnten. Die Markierung sollte eine spätere Abtrennung nicht an die cDNA gebundener Linker erleichtern. Nach der zur Erzeugung kohesiver Enden notwendigen *EcoRI* Hydrolyse sollten überschüssige Linker über eine Bio-Gel A50m Säule (32x0.2 cm) abgetrennt werden (Huynh *et al.* 1985). Aliquots der bei dieser Chromatographie erhaltenen Fraktionen (150 μL) wurden zur Größenanalyse der Transkripte auf einem 7.5 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Fraktionen, die nach Gelanalyse deutlich lange cDNA Fragmente enthielten, wurden vereinigt, die DNA mit EtOH präzipitiert und zur Ligation mit Lambda-gt11 (siehe Methoden) eingesetzt. Von den nach *in vitro* Verpackung erhaltenen rekombinanten (6.8×10^4 pfu), wegen der fehlenden α -Komplementation weiß gefärbten Plaques wurde aus 20 Klonen die DNA isoliert (Maniatis *et al.* 1982), mit *EcoRI* hydrolysiert und gelelektrophoretisch analysiert. Aus keinem der Phagenklone konnten am Gel sichtbare Inserts herausgeschnitten werden, worauf man wohl auf einklonierte kleine Linkerfragmente schließen muß, da wegen der weißen Färbung sicher Inserts vorhanden waren. Offensichtlich war die Abtrennung der Linker nicht erfolgreich oder es wurde bei der cDNA Präzipitation nur ein Bruchteil der DNA erfaßt.

Alternativ zur chromatographischen Linkerabtrennung wurde bei einer zweiten cDNA Synthese eine fraktionierte Isopropanolfällung versucht, die allerdings zu einem ähnlichen Ergebnis führte, das evtl. auch mit einer unvollständigen Klenow Reaktion und damit schlechter Linkeraddition erklärt werden kann.

cDNA Synthese nach Gubler und Hoffmann (1983)

Für weitere cDNA Synthesen wurden die inzwischen erhältlichen Kits eingesetzt, die, weitgehend auf der Methode von Gubler und Hoffmann (1983) basierend, die mit Schwierigkeiten behaftete S1-Nuklease- Behandlung umgehen (Fig. 29b). Die Synthese beider Stränge erfolgt hierbei im sog. "Eintopf"-Verfahren unter Verwendung klonierter Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverser Transkriptase. Die geringere Zahl an Manipulationen und die genau abgestimmten Bedingungen versprechen neben einer Arbeitserleichterung eine gute Ausbeute an cDNA.

BRL cDNA Synthesis System

Ausgehend von 5-10 µg Poly(A)mRNA wurden 0.88 bzw. 1.18 ng dscDNA (12%) erhalten. Die Länge des cDNA Transkriptes nach der Synthese des zweiten Stranges, aufgetrennt auf einem alkalischen Agarosegel (s. Methoden), lag zwischen 0.05 - 1.5 kb (Fig. 31). Zur Vorbereitung dieser cDNA zum Klonieren in Phagenvektoren wurde sie zuerst mit *EcoRI* Methylase methyliert, anschließend mit T4 DNA Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt, an welche mit [γ - 32 P]ATP phosphorylierte *EcoRI* Linker anligiert werden konnten. Die Beschreibung hierfür ist in Methoden gegeben und wurde in Anlehnung an Huynh *et al.* (1985) durchgeführt. Zur Abtrennung der überschüssigen Linker wurde die cDNA auf einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt und DNA größer als 500 bp über DEAE-Cellulose Filter isoliert (Methoden). Die Klonierung in Lambda-gt11 und *in vitro* Verpackung ergab 1.7×10^6 rekombinante Plaques; jedoch konnten nach DNA Isolierung (Lambdasorb, Methoden) und *EcoRI* Hydrolyse wiederum keine Inserts gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

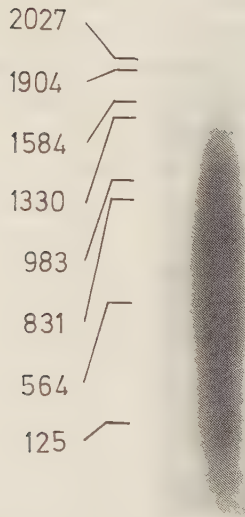


Fig. 31: cDNA Größenverteilung nach der Synthese mit dem BRL cDNA Synthesis System

Ein 3 μ L Aliquot der mit EtOH präzipitierten und in 20 μ L TE-Puffer gelösten cDNA ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ markiert) nach der Synthese des zweiten Stranges wurde auf einem 1.4%igen alkalischen Agarosegel aufgetrennt (7h, 80V) und nach dem Trocknen autoradiographiert. Als Größenvergleich wurde auf dem Gel 3 μ g einer *EcoRI/HindIII* geschnittenen Lambda-DNA aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Markergrößen sind am linken Rand angegeben.

Da in allen bisher beschriebenen Versuchen die cDNA Synthese an sich erfolgreich war, wurden die bei der Klonierung geschilderten Mißerfolge auf folgende Möglichkeiten eingegrenzt:

- die Behandlung mit Klenow Enzym oder T4 DNA Polymerase führte nicht zu einer für optimale Linkeraddition genügenden Anzahl glatter Enden
- die EtOH Präzipitation der cDNA war bei weitem nicht quantitativ
- eine vollständige Abtrennung der Linkermoleküle gelang in keinem Fall vollständig

Pharmacia Synthesis Kit

Der größte Vorteil dieses Systems gegenüber den bisher beschriebenen Verfahren besteht im Ersatz der Linker durch speziell angepasste Adaptoren. Die hier verwendeten *EcoRI* Adaptoren setzen sich aus zwei komplementären Oligonukleotiden zusammen, die einen Doppelstrang derart ausbilden, daß ein phosphoryliertes glattes Ende und ein nicht phosphoryliertes *EcoRI* überhängendes Ende entstehen:

AATTCGGCAG
GCCGTGCTCp

Bei der Verwendung solcher Adaptoren kann auf eine Methylierung cDNA interner *EcoRI* Schnittstellen und einer nachfolgenden *EcoRI* Hydrolyse verzichtet werden. Außerdem besteht nicht die Möglichkeit einer so massiven Multimerbildung wie bei Linkern, was zu einer leichteren Abtrennung überschüssiger Moleküle führen sollte.

Hierfür werden bei diesem System kleine Zentrifugations-säulen, gefüllt mit Sephacryl S-200 (sog. spun columns), eingesetzt, die den Vorteil bieten, bei Abtrennung der Adaptoren zu keinerlei Verdünnung der Probenlösung zu führen. Das Eluat dieser Säulen kann ohne Präzipitation der cDNA direkt zu weiteren Reaktionen eingesetzt werden, so daß unnötige DNA-Verluste vermieden werden. Voraussetzung für eine optimale Nutzung der Säulen ist allerdings ein exaktes Einhalten der Zentrifugationsbedingungen (400g, 2 min).

Die Synthese wurde nach Herstellervorschrift ausgehend von 4-5 µg Poly(A)mRNA durchgeführt. Diese eingesetzte Poly(A)mRNA entsprach selbstverständlich den geforderten Kriterien wie erfolgreicher Translation und Immunpräzipitation und positiver Hybridisierung mit den zur Verfügung stehenden DNA-Proben. Die Phosphorylierung der bereits an die cDNA ligierten Adaptoren erfolgte bei 37°C für 3h statt 30 min (Heinrich, pers. Mitteilung).

Wie in anderen Laboratorien (Heinrich, Domdey pers. Mitteilung) führte die cDNA Synthese zunächst nur zu Transkripten einer maximalen Länge von etwa 500 bp, die allerdings sowohl in pUC13 wie auch in Lambda-gt11 klonierbar waren. Dieses enttäuschende Ergebnis wurde von Pharmacia folgendermaßen erklärt: Das im Puffer zur Synthese des ersten Stranges enthaltene DTT wurde durch gleichzeitig anwesendes BSA bei längerer Lagerung oxidiert. Da DTT zur Aktivierung der reversen Transkriptase notwendig ist, sind bei dessen Zerstörung nur kurze cDNA Transkripte zu erhalten. Bei einer erneuten cDNA Synthese ausgehend von der gleichen Poly(A)mRNA Präparation mit einem von Pharmacia neu zusammengestellten Kit, bei dem DTT erst unmittelbar vor der Transkriptase-Reaktion zum Synthesepuffer zugegeben wird, wurden Transkripte im Bereich von 50 bis 2000 bp Länge erhalten (Fig. 32).

2027
1904
1584
1353
1078
831
564
310
194
125
72

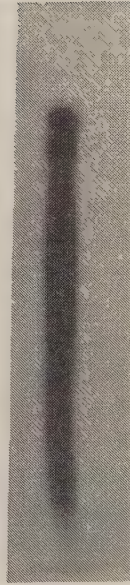


Fig. 32: Größenverteilung der cDNA nach der Synthese mit dem Pharmacia cDNA Synthesis Kit

Ein 5 μ L Aliquot nach der Synthese des 2. Stranges und Reinigung mittels "Spin column Chromatographie" wurde auf einem 7.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (6h, 100V), getrocknet und autoradiographiert. Als Größenvergleich wurden 4 μ g *Eco*RI/*Hind*III geschnittene Lambda-DNA, sowie 2 μ g eines PhiX174 DNA-Markers /*Hae*III hydrolysiert (Biolabs) aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Beide Marker sind am linken Rand angegeben.

Da für Cyanamidhydratase, ausgehend von einer Molmasse von ca. 28000, ein Genom von etwa 1000 bp erwartet wird, besteht somit bei dieser Synthese die Chance, einen cDNA Klon zu isolieren, der das gesamte Gen für dieses Enzym trägt.

Die über TCA-Fällung eines mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markierten Aliquots bestimmte Syntheserate betrug bei einem Einsatz von 4 μ g Poly(A)mRNA 833 ng (21%) cDNA. In der Literatur sind für eine erfolgreiche cDNA Synthese als Ausbeute etwa 15-30 % der eingesetzten mRNA angegeben (Klickstein 1987).

Test auf Klonierbarkeit der cDNA

Die mit *Eco*RI Adaptoren versehene cDNA sollte durch schnelles Klonieren in den mit *Eco*RI linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pUC13 (Pharmacia) auf ihre Klonierbarkeit getestet werden. Ein 10 μ L Aliquot (40 ng) der cDNA-Lösung wurde deshalb mit pUC13 ligiert (100 ng) und in kompetente JM83 Zellen transformiert (Hanahan 1983), welche auf Ampicillin-haltige (100 μ g/mL) LB-Agarplatten in Gegenwart von X-Gal (2%) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Hierbei wurden 2.5×10^4 Klone erhalten, wovon 95% auf Grund des Verlustes der Fähigkeit zur α -Komplementation, erkennbar an der weißen Farbe, als rekombinant identifiziert wurden. Aus willkürlich gewählten rekombinanten Klonen wurde die Plasmid-DNA im Schnellverfahren isoliert, mit *Eco*RI hydrolysiert und die Spaltprodukte im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Hydrolyse dieser Plasmid-DNAs führte in jedem Fall zu einem

individuellen Spaltmuster. Da keine Größenselektion der cDNA vorausgegangen war, variierten die Insertgrößen erwartungsgemäß zwischen 50 bp (Fig. 33 Spur 4) und 1700 bp (Fig. 33 Spur 9). Zur Erhöhung der Klonierungseffizienz sollte diese cDNA in den Expressionsvektor Lambda-gt11 kloniert werden.

Klonierung in Lambda-gt11 und *in vitro* Verpackung

Soll eine cDNA Genbank mit Antikörpern als Sonde abgesucht werden (Sorge *et al.* 1985, Crawford *et al.* 1986), wird sehr häufig der von Young und Davies (1983a) konstruierte Vektor Lambda-gt11 (Fig. 34) eingesetzt. Durch cDNA Einbau (bis zu einer Länge von 7.2 kb) in die *EcoRI* Schnittstelle 53 bp vor dem Terminationscodon des *lacZ* Gens kann die fremde genetische Information durch Induktion mit IPTG in Form eines β -Galactosidase-Fusionsproteins unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimiert werden.

Das Selektionsprinzip dieses Vektors beruht auf der *lac*-Inaktivierung, so daß rekombinante Lambda-gt11 Phagen auf Nährböden, die X-Gal und IPTG enthalten, statt der blauen Wildtyp-Plaques weiße Plaques liefern.

Für erfolgreiche *in vitro* Verpackung der nackten Phagen DNA in leere Phagenköpfe muß die DNA mindestens zwei *cos*-Stellen aufweisen, deren Abstand bei 38 bis 52 kbp (75 - 105 % des Lambda-Genoms) liegen muß. Die DNA zwischen diesen *cos*-Stellen ist dabei bedeutungslos (Hohn 1979).

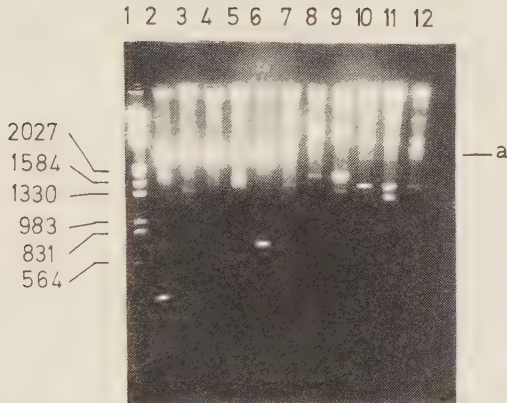


Fig. 33: *EcoRI* Hydrolyse von mit cDNA rekombinierter pUC13 DNA

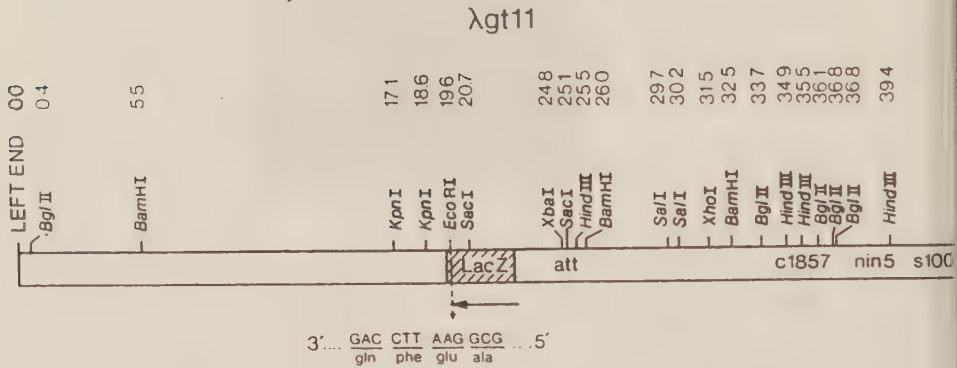
2 µg DNA wurden mit *EcoRI* hydrolysiert und auf einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt (5h, 120V).

- Spur 1: 4 µg Lambda-DNA gespalten mit *EcoRI/HindIII* als Marker
 Spur 2,4-12: rekombinante pUC13 DNA aus unterschiedlichen Klonen
 Spur3: Kontrolle, pUC13 DNA ohne Insert

Bande a entspricht dem linearisierten pUC-Vektor. Die zusätzlich zu dieser Bande sichtbaren DNA-Fragmente resultieren aus unterschiedlich langen cDNA Inserts (50-1700 bp). In den Spuren 7,8,10 und 12 ist Bande a auf Grund einer unvollständigen *EcoRI* Spaltung schwächer zu sehen. Die in den Spuren 9 und 11 aufgetrennte DNA enthält offensichtlich mehr wie 2 *EcoRI* Stellen, wovon mindestens eine blockiert zu sein scheint.

Fig. 34: Genkarte von Lambda-gt11
(nach Snyder et al. 1987)

Die Restriktionsschnittstellen sind vom linken Ende in Kilobasen (kb) angegeben. Die Sequenz der *EcoRI*-Stelle, die umgebenden Nukleotide und die Aminosäuresequenz ist unterhalb der Karte angegeben.



Zur Klonierung wurde die cDNA (0.2-0.5 µg) in Gegenwart von 20 ng/mL linearem Polyacrylamid (Aruffo und Seed 1987) mit EtOH präzipitiert, in wenig H₂O (2-4 µL) aufgenommen und mit dem bereits *EcoRI* hydrolysierten, mit alkalischer Phosphatase behandelten Lambda-gt11 Vektor (Promega) ligiert. Die Verpackung des Ligaseansatzes (*in vitro* packaging extract, Promega) erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 12°C.

Die Bestimmung des Phagentiters ergab 110700 rekombinante farblose Plaques (85%) gegenüber 16800 (15%) blauer Plaques insertfreier Phagen. Dieser Titer ist gut vergleichbar mit den von Williams (1981) für eine repräsentative cDNA Genbank geforderten 10^4 - 10^5 rekombinanten Klonen.

Gut voneinander zu trennende Einzelplaques wurden ausgestochen, in SM-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO₄) eluiert und erneut für eine Phagen-DNA Isolierung ausplattiert. Leider ist es, wie auch in anderen Laboratorien beobachtet (Donath, Domdey, Bräutigam DECHEMA, pers. Mitteilung), trotz Klonierung in eine *EcoRI* Stelle des Lambda Vektors oftmals nicht möglich, die klonierten Fragmente wieder mit *EcoRI* herauszuschneiden. Es scheint somit ein speziell für Lambda-gt11 zutreffendes Phänomen zu sein. Als Grund kann nur eine durch die Klonierung veränderte *EcoRI* Stelle vermutet werden. Um dies zu umgehen, wurden die isolierten Phagen DNA's mit *KpnI* und *SacI* hydrolysiert. Bei rekombinanten Phagen müßte sich das 2080 bp Fragment (Fig. 34) um die Größe des Inserts verlängern. Zur Kontrolle wurde ein blauer, nicht rekombinanter Phage ebenfalls isoliert und die DNA mit *KpnI* und *SacI* hydrolysiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 0.8%igen Agarosegel (Fig. 35). Gegenüber der Kontrolle (Fig. 35 Spur 5) ist das 2080 bp Fragment in allen anderen Spuren zu größeren Längen verschoben. Dieses individuelle Spaltmuster der willkürlich ausgewählten Phagenplaques läßt auf eine intakte repräsentative cDNA Genbank schließen.

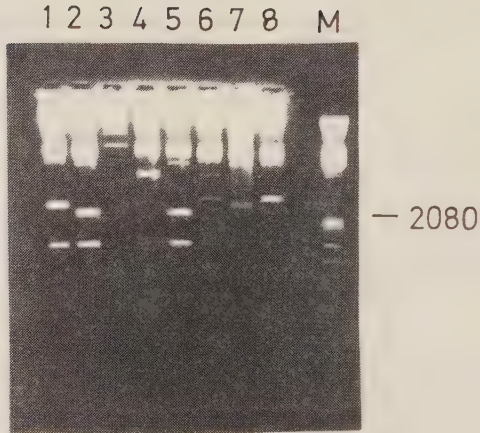


Fig. 35: *KpnI/SacI* Hydrolyse mit cDNA rekombinierter Lambda-gt11 DNA

5 µg Phagen-DNA wurden mit *KpnI/SacI* hydrolysiert und auf einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Deutlich sichtbar sind in allen Spuren die auf Grund der Genkarte (vgl. Fig. 34) zu erwartenden Fragmentgrößen (18.6, 17.1, 4.4, 1.5) sowie das gegenüber der Kontrolle (Spur 5) zu größeren Längen verschobene 2080 bp Fragment inserthaltiger Klone. Als Marker sind 3 µg Lambda DNA, gespalten mit *EcoRI/HindIII* aufgetragen (21.2, 5.1, 3.5, 2.0, 1.9, 1.3 kb).

Immunologisches Durchmustern der Lambda-gt11 Genbank

Polyklonale Antikörper eignen sich gut zum Durchmustern einer Genbank in Lambda-gt11. Crawford *et al.* (1986) zeigten dies am Beispiel des Gens für Nitratreduktase. Polyklonale Antikörper haben gegenüber monoklonalen den Vorteil multiple Epitope des Proteins zu erkennen; dies ist deshalb so wichtig, da cDNA Insertionen oftmals nicht die gesamte Länge des Gens beinhalten und somit nur Teile des Proteins exprimiert werden (Young und Davis 1983b).

Ermittlung der geeigneten Antikörper-Verdünnung

Voraussetzung für die Eignung von Antikörpern zum Durchsuchen einer cDNA Genbank basierend auf dem Expressionsvektor Lambda-gt11 ist die Möglichkeit, mit ihm in Immunblots deutliche Signale erzeugen zu können (Huynh *et al.* 1985). Da eine immunologische Reaktion in einem Western Blot Experiment mit einer Cyanamidhydratase-Präparation nach Chromatographie an Sephadex G-100 sowie Superose™ 12 HR10/30 bereits gezeigt war (Fig. 22), sollte die Empfindlichkeit der Immundetektion mit Hilfe der Immunodot-Methode (Hawkes *et al.* 1982) überprüft werden. Dazu wurden Cyanamidhydratase-Lösungen verschiedener Konzentration (0-1 µg) auf Nitrocellulose-Filter aufgetragen und nach dem Trocknen analog den Western Blot Filtern (siehe Methoden) mit einer Antiserumverdünnung von 1:100 bzw. 1:300 in 1% BSA/TBS behandelt. Die Immunreaktion wurde durch Inkubation mit [¹²⁵I]Protein A und Auto-radiographie der Filter über Nacht sichtbar gemacht. Eine Antikörperverdünnung von 1:100 war in der Lage, 1 ng Cyanamidhydratase sichtbar zu erkennen;

Selbst bei einer Verdünnung von 1:300 konnten noch 4 ng Cyanamidhydratase nachgewiesen werden (Fig. 36). Mit dem Biotin-Streptavidin-System (Amersham) und anschließender Farbreaktion mit Diaminobenzidin konnten nur 125 ng Cyanamidhydratase sichtbar gemacht werden (ohne Beleg). Zum Durchmustern der Genbank wurde deshalb stets eine Antikörperversdünnung von 1:100 eingesetzt und die Immunreaktion mit [125 J]Protein A nachgewiesen.

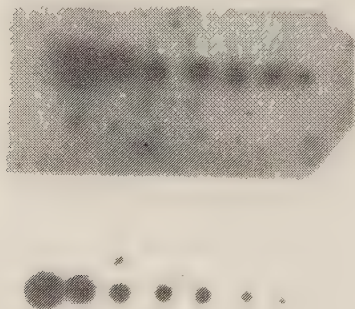


Fig. 36: Immunodot

Auf beiden Filtern wurden von links nach rechts folgende Cyanamidkonzentrationen aufgetragen: 1 μ g, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 4 ng, 2.5 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.2 ng, 0 ng.

Beide Filter wurden analog der für Westernblots angegebenen Vorschrift (s. Methoden) behandelt lediglich mit dem Unterschied, daß Filter A mit einer Antikörperversdünnung von 1:100, Filter B mit einer Verdünnung von 1:300 inkubiert wurde.

Immunscreening

Nach Williams (1981) sind für eine repräsentative cDNA Genbank 10^4 - 10^5 rekombinante Klone erforderlich. Die in dieser Arbeit erhaltenen 109700 rekombinanten Phagenklone sind somit für ein immunologisches Durchmustern nach dem Gen für Cyanamidhydratase ausreichend. Nach der von Clark und Carbon (1976) entwickelten Formel

$$N = \ln (1-P) / \ln (1-1/n)$$

(N= Zahl der zu testenden Klone, n= minimale Anzahl der zu testenden Klone, P= Wahrscheinlichkeit)

hätten, um einen Klon mit 99%iger Wahrscheinlichkeit repräsentiert zu finden, 9200 Klone getestet werden müssen. Ausgegangen wurde dabei von einer maximalen Genomgröße des Pilzes von 5×10^7 und einer Komplexität (Anzahl unterschiedlicher mRNA Sequenzen) der mRNA von 2000 (abgeleitet von Bishop *et al.* 1974). Zur Sicherheit wurden 50000 Klone durchgemustert. Bei der Berechnung wurde von einer geringen Kopienzahl der mRNA ausgegangen, da die Steigerung der Syntheserate der Cyanamidhydratase nicht zwingend auf eine Induktion der DNA Transkription sondern ebenso auf eine Induktion der RNA Translation zurückgeführt werden könnte.

Nach Ausplattieren der gesamten Genbank auf *E. coli* Y1090 Zellen wurde etwa die Hälfte (ca. 5.5×10^4 pfu) von den Agarplatten nach Zellyse mit SM-Puffer eluiert (Maniatis *et al.* 1982).

Der Titer dieser amplifizierten Genbank betrug 1×10^9 pfu. Die von Young und Davies (1983a, 1983b) für das Gen der RNA Polymerase II aus Hefe entwickelte Methode wurde den veränderten Umständen angepasst. Zunächst wurden 5.5×10^4 pfu der nicht amplifizierten Lambda-gt11 cDNA Genbank, die auf 25 LB-Agarplatten in einer Dichte von 2×10^3 pfu pro 145 mm Platte nach Adsorption an *E. coli* Y1090 Zellen ausplattiert waren (s. Methoden), bei 42°C bis zum Auftreten winziger Plaques (ca. 3h) inkubiert. Erst dann wurde die Transkription vom *lacZ*-Promotor durch Auflegen eines mit 10 mM IPTG getränkten, getrockneten Nitrocellulose-Filter induziert. Nach Inkubation über mehrere Stunden bei 37°C können die Filter, die nun Protein von lysierten Zellen in den Plaques gebunden hatten, von den Platten abgezogen werden, mit Antikörper inkubiert und positive Signale durch [125 J]Protein A sichtbar gemacht werden (s. Methoden). Trotz effizienter chromatographischer Reinigung der Sera könnten die Antikörper in der Lage sein, *E. coli* Antigene zu erkennen, so daß daraus beim Absuchen der cDNA Genbank ein hoher Hintergrund und falsch positive Signale resultieren können (Huynh *et al.* 1985, Snyder *et al.* 1987). Durch Vorinkubation der Sera mit 1:100 verdünntem *E. coli* Lysat wurde diesen Effekten vorgebeugt (Snyder *et al.* 1987).

Deutlichere Signale wurden durch die Inkubation mit Antikörperlösung über Nacht bei 4°C statt nur 2h bei Raumtemperatur erreicht. Eine weitere Reduzierung des Hintergrundes konnte durch ein je achtmaliges Waschen (je 15 min) der Filter in 2% Milchpulver/0.1% NP-40/TBS bei 4°C sowohl nach der Antikörper- als auch der [125 J]Protein A Behandlung erreicht werden.

Ein eindeutig positives Signal konnte mit einem Plaque zur Deckung gebracht werden (Fig. 37 A). Zur Kontrolle wurde dieser Plaque mit einem zweiten benachbarten, der kein Signal zeigte, ausgestochen, aus dem Nährboden eluiert, vermischt und über mehrere Schritte in unterschiedlichen Verdünnungsstufen angereichert (Fig. 38). Wie zu erwarten

zeigten 50% der Signale eine positive Reaktion. Die Induktion mit IPTG wurde hier teilweise über Nacht durchgeführt, was eine bessere Expression und somit deutlichere Signale zur Folge hatte. Durch die kurze Induktionszeit (3h) beim Durchmustern der Genbank könnten somit weitere "positive" Signale übersehen worden sein. Deshalb wurden 4×10^5 pfu des amplifizierten Teils der Lambda-gt11 Genbank (2×10^3 pfu pro Platte) ausgesät und der mit 10 mM IPTG behandelte Filter über Nacht (14h) bei 37°C auf der Platte belassen, wodurch eine Verstärkung der Signale um das 5-10fache erreicht werden konnte. Da in der Literatur für die Klonierung des menschl. Glucocerebrosidase Gens (Sorge *et al.* 1985) 1×10^6 und für die Klonierung des Luciferase Gens aus Firefly (De Wet *et al.* 1985) 1.5×10^5 (davon aber nur 1.5×10^4 rekombinante) Klone der entsprechenden amplifizierten cDNA Genbanken immunologisch durchmustert wurden, ist die hier gewählte Zahl sicher ausreichend. Bedingt durch die Amplifikation stieg natürlich die Anzahl der positiven Signale (Fig. 37 B). Von den insgesamt 87 Plaques, die in der ersten Runde des immunologischen Screenings ausgestochen, in 1 mL SM-Puffer eluiert und erneut nach Adsorption an *E.coli* Y1090 Zellen ausplattiert wurden, zeigten 55 Klone eindeutig positive Signale. Zur Kontrolle wurden wiederum Plaques, die kein Signal ergaben, mitgetestet.

Bei den Anreicherungs-schritten wurde zur Detektion auch ein nichtradioaktives Verfahren eingesetzt. Nach der Inkubation mit den Cyanamidhydratase-spezifischen Immunglobulinen wurde für 2h mit Anti-Kaninchen-Antikörpern, an die alkalische Phosphatase gekoppelt war, inkubiert und nach einem anschließenden Waschvorgang die Immunreaktion mit farbentwickelnden Substraten sichtbar gemacht (Proto Blot Lambda-gt11 Immunoscreening System, Promega).

Klone, die mit [125 J]ProteinA ein Signal zeigten, lieferten auch mit diesem Verfahren eine positive Farbreaktion. In Fig. 39 A ist die positive Reaktion (im Original violett), in Teil B die Negativkontrolle gezeigt.

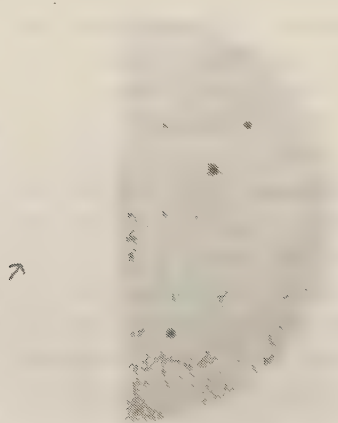


Fig. 37: Durchmustern der Genbank mit unterschiedlichen IPTG-Induktionszeiten, Detektion mit [125 J]Protein A

A: Induktion: 3h, 10 mM IPTG
nicht amplifizierte Genbank

B: Induktion: 14h, 10 mM IPTG
amplifizierte Genbank

Beide Filter zeigen lediglich einen repräsentativen Querschnitt der getesteten Klone.

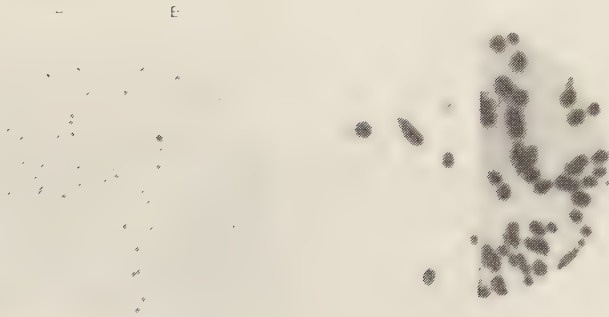


Fig. 38: Anreicherung eines beim ersten Durchmustern immunpositiven Signals

Ein Plaque, der ein positives Signal mit [^{125}J]ProteinA zeigte, wurde mit einem in der Nähe liegenden "negativen" Plaque ausgestochen, vermischt und erneut getestet.

- A: 10^3 Verdünnung; die Induktion mit dem IPTG-Nitrocellulose-Filter erfolgte für 3h bei 37°C
50% positive Signale wurden erhalten
- B: 10^4 Verdünnung; Induktion analog A
50% positive Signale
- C: 10^5 Verdünnung; die Induktion mit dem IPTG-Filter erfolgte über Nacht (14h)
50% positive Signale
- D: 10^4 Verdünnung; ein positiver Einzelplaque aus C wurde erneut unter den gleichen Bedingungen getestet
100% positive Signale

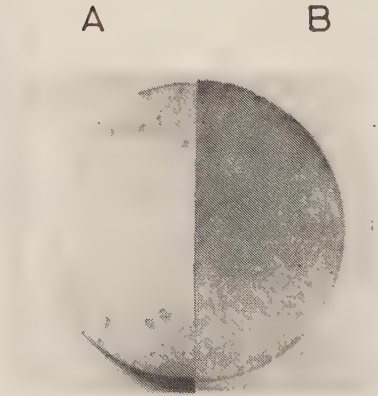


Fig. 39: Immundetektion über Farbreaktion

- A: positive Reaktion mit einem Klon, der auch mit [125 J]ProteinA ein Signal zeigte; ausgesät in 10^5 Verdünnung.
- B: Kontrolle: ein Klon, der auch mit der radioaktiven Methode kein Signal zeigte; in 10^5 Verdünnung ausgesät.

Charakterisierung der Klone

EcoRI Hydrolyse

Von den Klonen, die eindeutig positive Signale über mehrere Anreicherungsschritte lieferten, wurde die DNA isoliert und mit *EcoRI* hydrolysiert (s. Methoden). Aus der DNA jedes Klon ließ sich mit *EcoRI* ein spezifisches DNA Fragment heraus schneiden. Die Fragmentgrößen lagen zwischen 100 bp und 950 bp. Einige Klone zeigten die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit der Insertfragmente im elektischen Feld, was auf Grund der Amplifikation erklärbar ist. Insgesamt wurden 13 verschieden lange Insertionen erhalten, einige davon sind in Fig. 40 gezeigt. Der aus der nicht-amplifizierten Genbank isolierte positive Klon enthielt ein Insert von lediglich 100 bp Länge (ohne Beleg).

Expression klonierter cDNA als Fusionsprotein

Die zur Expression nötige lysogene Phagenvermehrung wurde durch Infektion von *E. coli* Y1089 mit rekombinanten Lambda-gt11 Phagen erreicht. Da sich die singuläre *EcoRI* Schnittstelle, in welche die cDNA einkloniert ist, 53 bp stromaufwärts des Terminationscodons des β -Galactosidase-Gens befindet, resultiert bei korrekter Orientierung und richtigem Leserahmen ein Fusionsprotein. Das Molekulargewicht dieses Fusionsproteins setzt sich aus dem β -Galactosidaseanteil ($M_r = 114000$, Young und Davis 1983a) und dem von der einklonierten cDNA exprimierten Anteil zusammen. Das Gen für das Fusionsprotein steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors und dessen Expression kann somit durch IPTG Zugabe während des Bakterienwachstums induziert werden.

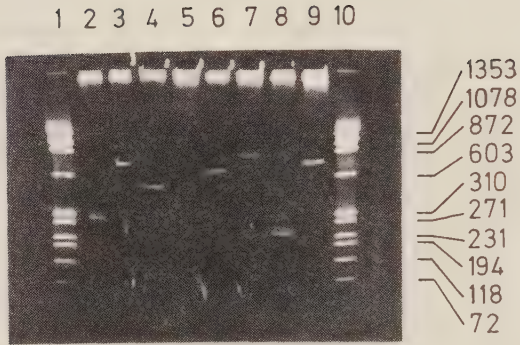


Fig. 40: *Eco*RI Hydrolyse von DNA aus immunpositiven Lambda-gt11 Klonen

Je 5 µg Phagen-DNA wurden mit *Eco*RI hydrolysiert und auf einem 7.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (100V, 5h). In Spur 1 und 10 sind je 4 ng eines PhiX 174 DNA-Markers (*Hae*III hydrolysiert) aufgetragen.

Die Spuren 2-9 zeigen die hydrolysierten immunpositiven Lambda-gt11 Klone.

Dieser Expressionsversuch wurde mit drei sich in der Länge der cDNA Insertion unterscheidenden Lambda Klonen durchgeführt. Die nach Induktion mit IPTG und Zellaufschluß auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zeigen Unterschiede im Bandenmuster bei Größen oberhalb der β -Galactosidase (Fig. 41). Im Vergleich zu den als Kontrolle aufgetragenen Proteinen eines entsprechenden Versuchs mit Wildtyp Lambda-gt11 (Spur 1 Bande a) zeigen Spur 2-4 eine Verschiebung der Bande a zu höheren Molekulargewichten. Wie zu erwarten ist das Ausmaß der Verschiebung mit der Länge der insertierten cDNA korrelierbar. Die kleinste Verschiebung ($114000 \pm \text{ca. } 6600$) der Bande a, zeigt in Spur 2 die cDNA mit einer Insertion von 200 bp Länge, die größte ($114000 \pm \text{ca. } 30300$) der cDNA klon mit einer Insertion von 910 bp Länge (Spur 4).

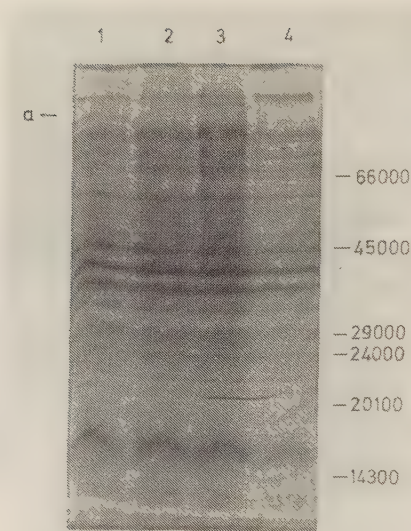


Fig. 41: Expression von β -Galactosidase Fusionsproteinen

Die Gewinnung der Lysogenen sowie die Expression der Fusions-proteine sind im Methodenteil beschrieben. Die lysierten Zellen wurden auf einen 17%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (150 V, 5.5h) und mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt. Die angezeigten Banden sind am Original deutlich zu erkennen.

Spur 1: Lambda-gt11 ohne Insert

Spur 2: Lambda-gt11 mit 200 bp cDNA Insert

Spur 3: Lambda-gt11 mit 820 bp cDNA Insert

Spur 4: Lambda-gt11 mit 910 bp cDNA Insert

Am rechten Rand sind als Markergrößen angegeben:

Lactalbumin (14200 D)	Trypsininhibitor (20100 D)
Trypsiogen (24000 D)	Carboanhydrase (29000 D)
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (36000 D)	
Albumin aus Ei (45000 D)	
Albumin vom Rind (66000 D)	

DISKUSSION

Die Cyanamidhydratase ist kein konstitutives Enzym, sondern deren Synthese wird erst durch Zugabe von Cyanamid als alleiniger Stickstoffquelle im Medium induziert (Fig. 22). Pilze, die in Medium mit KNO_3 als Stickstoffquelle gewachsen waren, zeigen keine Cyanamidhydrataseaktivität. Diese Induktion der Cyanamidhydratase konnte durch elektrophoretische Auftrennung von Gelfiltraten von Pilzen, gezüchtet in Medium mit Cyanamid, im Vergleich zu Pilzen mit KNO_3 als Stickstoffquelle und anschließende Western-blotexperimente mit den spezifischen Immunglobulinen gezeigt werden (Fig. 22 Spur 2 und 3 Bande a).

Vergleichbare Induktionsphänomene sind sowohl für Pro- als auch für Eukaryoten beschrieben. Als Beispiel für Prokaryoten sei hier die Cyanase aus *E. coli* ($M_r = 150000$, 8-10 Untereinheiten) erwähnt, welche die Hydrogencarbonat-abhängige Umsetzung von Cyanat (OCN^-) zu Ammoniak und Bicarbonat katalysiert (Anderson et al. 1986).

Für Eukaryoten lassen sich z. B. Säugerenzyme, die für den Stoffwechsel bestimmter Aminosäuren benötigt werden wie z.B. die Tryptophan-2,3-Oxygenase in der Leber, anführen. Besonders erwähnenswert erscheinen auch induzierbare Enzyme aus Pilzen wie z.B. der qa-Cluster aus *Neurospora crassa*. In diesem Cluster sind regulatorische und Strukturgene zusammengefasst, deren Proteine für den Katabolismus von Chinasäure und Shikimisäure nötig sind (Huiet und Case 1985). Die Induktion dieser Proteine ist über *de novo* Synthese belegt (Reinert und Giles 1977). So ist z. B. qa-3 mRNA (codiert für Shikimisäure-Dehydrogenase und Chinasäure-Dehydrogenase) nur in induzierten Pilzzellen nachzuweisen (Reinert et al. 1981). Ähnliche Verhältnisse wie in diesem Enzym sind auch für die Cyanamidhydratase denkbar.

Im Gegensatz zu Stransky und Amberger (1973) wurde bei einer ersten Anreicherung durch Ammoniumsulfatfällung die Hauptaktivität nicht bei 70-90% Sättigung, sondern schon im Bereich von 30-60% Sättigung gefunden (Tab. 2). Dies kann nicht auf die Erhöhung des pH-Wertes (pH 8.0- 10 mM TrisHCl) zurückgeführt werden, da auch im anfangs verwendeten McIlvaine-Puffer (pH 6.0) nach Stransky und Amberger (1973) die Aktivität, wenn auch absolut geringer, in der Fraktion bis 65% Sättigung gefunden wurde.

Die vergleichbaren Nitrilhydratasen aus *Rhodococcus* sp. (Endo und Watanabe 1989), *Pseudomonas chlororaphis* (Nagasawa und Yamada 1987) und *Brevibacterium* R312 (Nagasawa et al. 1986) zeigen ebenfalls eine erste Anreicherung durch eine Ammoniumsulfatfällung im Bereich von 30-60% Sättigung. Die genannten Enzyme katalysieren die Umsetzung von Nitrilen zu den entsprechenden Amiden ($\text{R}\equiv\text{CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$ R= Alkyl oder Alkenyl).

Auch die von Stransky und Amberger (1973) belegte Aktivitätserhöhung der Cyanamidhydratase durch Zusatz von 10^{-3} - 10^{-4} M Mangan konnte nicht bestätigt werden. Die für ein gereinigtes Enzym gefundene Aktivität lag mit 10^{-3} M Mangan sogar ca. 40% unter derjenigen ohne Manganzusatz (Tab. 1). Der hemmende Effekt ist im Rohextrakt, in dem Mangan vermutlich durch andere Proteine abgefangen wird, nicht so bedeutend.

Über eine Gelfiltration an Sephadex G-100 und anschließender Chromatographie an Superose 6 HR10/30 bzw. Superose 12 HR10/30 (Fig. 10, 11, 12) gelang insgesamt eine Anreicherung um den Faktor 11. Der tatsächliche Anreicherungsfaktor dürfte jedoch höher liegen, da aus einer densitometrischen Abschätzung einer elektrophoretischen Analyse in Gegenwart von SDS hervorgeht, daß die Cyanamidhydratase im Rohextrakt nicht bereits zu 9% enthalten ist (Fig. 18 Spur 1), sondern nur zu höchstens

2%. Außerdem liegen an dieser Stelle sicher mehrere Proteine mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld.

In "Western-Blot" Experimenten (Fig. 22) war neben der der Cyanamidhydratase entsprechenden Bande a noch eine zweite, immunreaktive Proteinzone b zu erkennen, die einem proteolytischen Abbauprodukt entspricht, da sie besonders bei längerer Lagerung oder bei noch mit anderen Proteinen verunreinigten Präparationen auftrat. Diese Vermutung konnte auch durch Estermaier (1988) in gelelektrophoretischen Analysen von Cyanamidhydratasepräparationen nach unterschiedlicher Lagerzeit bestätigt werden.

Bei den Dialysen und bei der ersten Ammoniumsulfatfällung treten sehr hohe Aktivitätsverluste auf. Eine Erklärung bietet der Verlust eines für die Aktivität essentiellen Cofaktors. Ein solcher wurde mit Pyrrolo-chinolinchinon (PQQ) für die Nitrilhydratase aus *Brevibacterium* R312 bereits nachgewiesen und für die Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* vermutet (Nagasawa und Yamada 1987). Allerdings spricht der Befund, daß der Großteil der Aktivität nur bei der ersten Ammoniumsulfatfällung der Cyanamidhydratase verloren geht, wohingegen spätere Gelfiltrationen oder Ammoniumsulfatfällungen kaum noch zu Aktivitätsverlust führen (Tab. 3), dagegen. Gegen ein Coenzym spricht auch, daß sich die aus einem SDS-Polyacrylamidgel isolierte Cyanamidhydratase-Bande zu einem aktiven Enzym ohne weitere Zusätze rekonstituieren ließ (Fig. 18, Tab. 7).

Auffallend ist, daß außer durch Gelfiltration keine anderen Verfahren wie z.B. die Ionenaustauschchromatographie, Dialyse oder Fällungen mit organischen Lösungsmitteln (Aceton) zu einer Anreicherung oder Konzentrierung der Aktivität führten.

Lediglich die hydrophobe Chromatographie ergab erste Hinweise über eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung inaktiver Proteine (Fig. 13, Tab. 4).

Die Cyanamidhydratase unterscheidet sich darin von allen anderen vergleichbaren, die CN-Gruppe hydratisierenden Enzymen. Die Nitrilhydratasen aus *Brevibacterium* R312 und *Pseudomonas chlororaphis* (Nagasawa und Yamada 1987) sowie die Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* (Endo und Watanabe 1989) ließen sich über Chromatographie an DEAE-Cellulose bzw. Sephacel, Phenyl-Sepharose und anschließender Gelfiltration an Sephadex G-150 weiter anreichern. Auch die Dialyse bereitete bei diesen Enzymen keine Schwierigkeiten. Das gleiche gilt für Enzyme, die aromatische Nitrile zu den entsprechenden Säuren umsetzen ($R\equiv CN + 2H_2O \rightarrow R-COOH + NH_3$, R= arom.), wie die Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae* (Stalker et al. 1988) oder die Benzonitrilase aus *Nocardia* (Harper 1977).

Für die Cyanamidhydratase wurde eine hohe Substratspezifität beobachtet, da sie nicht in der Lage ist, weder ihr Dimeres Dicyandiamid (diese Arbeit) oder Cyanid (Estermaier 1988) zu hydratisieren. Diese hohe Substratspezifität ist weder bei den Nitrilhydratasen aus *Pseudomonas chlororaphis* B23 (Nagasawa et al. 1987) und *Brevibacterium* R312 (Nagasawa et al. 1986), die neben dem bevorzugten Substrat Propionitril auch noch andere aliphatische Nitrile mit 3-6 C-Atomen umsetzen, noch bei der Benzonitrilase aus *Nocardia* SP (Harper 1977) gegeben. Das letztgenannte Enzym setzt neben Benzonitril vor allem noch meta- und para- substituierte Benzonitrile zur entsprechenden Säure um.

Im Gegensatz dazu steht die β -Cyanoalaninhydrolase aus höheren Pflanzen (blaue Lupine), die spezifisch die Umsetzung von β -Cyanoalanin zu Asparagin katalysiert (Castric et al. 1972). Sehr substratspezifisch ist auch die Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae*, die das Herbizid

Bromoxynil (3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril) umgesetzt und lediglich noch die entsprechenden Chlor- und Jodsubstituierten Derivate als Substrat erkennt (Stalker et al. 1988).

Die Cyanamidhydratase scheint auf Grund des relativ hohen K_M -Wertes von 27 mM keine besonders gute Affinität zu Cyanamid zu besitzen. Eine Substratsättigung wird erst bei 100 mM Cyanamid erreicht (Fig. 15 und 16).

Die K_M -Werte von mit der Cyanamidhydratase vergleichbaren Enzymen liegen meist 1-2 Zehnerpotenzen niedriger (K_M der β -Cyanoalaninhydrolase: 2 mM (Castric et al. 1972), der Benzonitrilase aus *Nocardia* SP: 4 mM für Benzonitril (Harper 1977), der Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae*: 0.31 mM (Stalker et al. 1988) und der Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* B23: 29 mM mit Propionitril als Substrat (Nagasawa et al. 1987). Man könnte annehmen, daß trotz der hohen Substratspezifität der Cyanamidhydratase für Cyanamid das natürliche Substrat für dieses Enzym noch nicht gefunden ist.

Die Aktivität der Cyanamidhydratase ist mit einem Maximum bei 50-55°C über einen großen Temperaturbereich hin stabil (Fig. 17). Ebenfalls über einen breiten Temperaturbereich (10-55°C) stabil ist die Nitrilase aus *Klebsiella*. Das Maximum liegt hier bei 35°C (Stalker et al. 1988).

Die Benzonitrilase aus *Nocardia* ist im Temperaturbereich von 20-40°C aktiv (Harper 1977). Im Gegensatz dazu liegt bei der Nitrilhydratase aus *Pseudomonas* das Aktivitätsmaximum bei 20°C (Nagasawa et al. 1987).

Auf Grund der relativen Molmasse der Cyanamidhydratase von 28840 ± 1000 im denaturierten Zustand (Fig. 20) und von 169800 im nativen Zustand (Estermaier 1988) besteht Evidenz für eine hexamere, aus identischen Polypeptidketten von je ca. 280 Aminosäuren zusammengesetzte Struktur.

Daß es sich bei dem Protein mit dem Molekulargewicht von 28840 ± 1000 tatsächlich um Cyanamidhydratase handelt, konnte durch ein Rekonstitutionsexperiment (Fig. 18) mit dem Wiedererlangen der enzymatischen Aktivität (Tab. 7) nur aus dieser aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel isolierten Bande gezeigt werden. Die Homogenität dieser Bande zeigte sich auch in einer 2D-Gelelektrophorese, durchgeführt mit einer Enzympräparation nach Chromatographie an der Superose-Säule. Diese Bande zeigte nur einen Punkt, der mit den Antikörpern kreuzreagierte (Maier 1989, in Vorbereitung). Damit läßt sich die Cyanamidhydratase mit der Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* ($M_r = 100000$) vergleichen, die aus vier gleichen Untereinheiten zu je 25000 zusammengesetzt ist (Nagasawa *et al.* 1987), oder auch mit der Benzonitrilase aus *Nocardia* ($M_r = 560000$), die aus 12 identischen Untereinheiten zu je 45000 besteht. Das Oligomer der Cyanase aus *E. coli* ($M_r = 150000$) ist ebenfalls aus 8-10 identischen Monomeren zusammengesetzt. Die Cyanase katalysiert die Hydrogencarbonat-abhängige Umsetzung von Cyanat zu Ammoniak und Hydrogencarbonat (Little und Anderson 1987). Aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten setzen sich dagegen die Nitrilhydratase aus *Brevibacterium* R312 ($M_r = 77000$, Untereinheiten 26000 und 27500, Nagasawa *et al.* 1986) und die Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* ($M_r = 70000$, Untereinheiten 28500 und 29000, Endo und Watanabe 1989) zusammen.

Da selbst unter dissoziierenden und reduzierenden Bedingungen noch ein immunreaktives Cyanamidhydratase-Dimer nachzuweisen ist (Fig. 21 und 22), wird die Vermutung gestützt, die Cyanamidhydratase sei wie Cyanase aus *E. coli* ebenfalls aus Dimeren (Little und Anderson 1987) und zwar der Form $(\alpha_2)_3$ aufgebaut. Das Auftreten dieses Dimeren ($M_r : 60000$) bei gelelektrophoretischen Analysen wurde auch von Estermaier (1988) beobachtet.

Obwohl Dimere im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel nicht erwartet werden sollten, wurde dies auch bei der Nitrilase aus *Klebsiella ozaenae* ($M_r = 72000$, zwei Untereinheiten zu je 37000) beobachtet (Stalker et al. 1988).

Noch nicht geklärt ist, ob als Bedingung für die Aktivität das Vorliegen der Cyanamidhydratase als Oligomer (169800) nötig ist oder ob das Monomere (28840) bereits aktiv ist. Bei der Benzonitrilase aus *Nocardia* führt erst die Assoziation der 12 Untereinheiten in Gegenwart des Substrats zur Bildung des aktiven Enzyms (Harper 1977). Auch bei der Cyanase aus *E. coli* (Little und Anderson 1987) ist nur das Oligomere, bestehend aus vier Dimeren, aktiv. Ein Dimeres hingegen ist inaktiv.

Das Monomere der Nitrilhydratase aus *Klebsiella ozaenae* ist ebenfalls inaktiv, die aktive Form des Enzyms besteht aus zwei identischen Untereinheiten (Stalker et al. 1988). Auf Grund dieses Vergleichs kann man für die Cyanamidhydratase vermuten, daß die aktive Form des Enzyms auch das Oligomere ist.

Die beim Durchmustern der cDNA Genbank in Lambda-gt11 identifizierten 56 immunpositiven Klone enthalten vermutlich Genfragmente der Cyanamidhydratase.

Für die Tatsache einer ausschließlichen Erkennung von Cyanamidhydratase durch die verwendeten Antikörper sprechen folgende Punkte:

- Die Antikörper wurden über eine CNBr-aktivierte Sepharose-Säule, an die Gelfiltrate der Cyanamidhydratase gebunden waren, gereinigt. Nur solche gereinigten Antikörper wurden zum Test eingesetzt.
- Weiterhin wurde zum Immunscreening *E. coli* -Lysat zugegeben, um möglichen *E. coli* Protein-Antikörper-Wechselwirkungen vorzubeugen.

Die Spezifität der Antikörper wurde in mehreren von einander unabhängigen Experimenten belegt:

1. Inhibierung der Enzymaktivität

Durch Vorinkubation der Cyanamidhydratase mit Antiserum (2h) wird die Aktivität des Enzyms um ca. 90% reduziert (Tab. 6). Selbst bei Durchführung des Aktivitätstests sofort nach Zugabe des Antiserums erfolgt noch eine 51%ige Hemmung (ohne Beleg). Somit können keine evtl. im Antiserum enthaltenen Proteasen für den Hemmeffekt verantwortlich gemacht werden, zumal das Serum affinitätsgereinigt war.

2. Westernblot

Die Antikörper reagierten nur mit der Cyanamidhydratase spezifischen Bande, dem Dimeren und dem proteolytischen Abbauprodukt nicht aber mit anderen noch im Gelfiltrat enthaltenen Proteine (Fig. 22, Fig. 18).

3. Die Immunelektrophorese, durchgeführt mit unterschiedlichen Reinigungsstufen der Enzympräparation, zeigte nur eine Präzipitationslinie (Fig. 6).

Die Inhibierung des ELISA-Tests (Fig. 5) ebenso wie die einheitliche Präzipitatbildung im Ouchterlony-Test (Fig.1) zeigen die Spezifität der Antisera für Cyanamidhydratase.

4. In einem *in vitro* Translationsansatz mit der isolierten Poly(A)mRNA konnte mit diesen Antikörpern ein Translationsprodukt präzipitiert werden, dessen Molmasse der der Cyanamidhydratase entsprach (Fig. 25 und 26).

Die angereicherten immunpositiven Klone enthielten insgesamt 13 verschieden große Insertfragmente (zw. 100-950 bp). Eine Sequenzierung dieser insertierten cDNA's sollte der nächste Schritt zur Identifizierung des Cyanamidhydratasegens sein, was den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überstiegen hätte. Da die Expression klonierter positiver cDNA Fragmente als Fusionsproteine gezeigt wurde (Fig. 41),

kann diese Cyanamidhydratase mit gängigen proteinchemischen Methoden für weitere Untersuchungen angereichert werden.

Der endgültige Nachweis für das funktionsfähige Gen ist jedoch erst die Fähigkeit des Expressionsproduktes zur Hydrolyse von Cyanamid im Standardaktivitätstest. Da die Expression in *E. coli* und nicht in *M. verrucaria* durchgeführt wird, muß dabei allerdings davon ausgegangen werden, daß für die Aktivität der Cyanamidhydratase kein Cofaktor nötig ist, der in *E. coli* nicht existiert.

LITERATUR

- Anderson, P. (1980)
Purification and Properties of the inducible Enzyme Cyanase.
Biochemistry **19**, 2882-2888
- Aruffo, A. und Seed, B. (1987)
Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 8573-8577.
- Aviv, H. und Leder, P. (1972)
Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 1408-1412.
- Bauer, F. (1965)
Z. f. Pflanzenkrankh., Pfl.-Schutz, Sonderheft III
- Bergmeyer, H. U. (1983)
Quantities and Units. in: *Methods of Enzymatic Analysis*,
Vol. I, S. 12, Verlag Chemie, Weinheim.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976)
Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials
Anal. Biochem. **70**, 241-250.
- Bishop, J. O.; Morton, J. G.; Rosbash, M. und Richardson, M. (1974)
Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA.
Nature **250**, 199-204.
- Blumberg, D. (1987)
Creating a Ribonuclease-Free Environment.
Methods Enzymol. **152**, 21-24.
- Bolton, A. E. und Hunter, W. M. (1973)
Labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to an iodine-125-containing acylating agent.
Application to the radioimmunoassay.
Biochem. J. **133**, 529-538.

- Buckland, J.; Collins, R. E. und Pullin, E. M. (1973)
Metabolism of bromoxynil octanoate in growing wheats.
Pestic. Sci. **4**, 149.
- Castric, P.; Farnden, K. und Conn, E. (1972)
Cyanide Metabolism in Higher Plants.
Arch. Biochem. Biophys. **152**, 62-69.
- Cheung, A. Y.; Bogorad, C.; van Montagu, M. und Schell, J. (1988)
Relocating a gene for herbicide tolerance: A chloroplast gene is converted into a nuclear gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 391-395.
- Chirgwin, J. J.; Przbyla, A. E.; MacDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979).
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry **18**, 5294-5297.
- Clarke, L. und Carbon, J. (1976)
A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome.
Cell **9**, 91-99.
- Collins, R. F. (1973)
Perfusion studies with bromoxynil octanoate in soil.
Pestic. Sci. **4**, 181.
- Crawford, N. M.; Campbell, W. H. und Davies, R. W. (1986)
Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8073-8076.
- Cuatrecasas, P.; Wilchek, M. und Anfinsen, C. B. (1968)
Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **61**, 636-643.
- Davies, J. W.; Aalbers, A. M. J.; Stuik, E. J. und van Kammen, A. (1977)
Translation of cowpea mosaic virus RNA in cell-free extract from wheat germ.
FEBS Lett. **77**, 265-269.

- DeBlock, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gossele, V.; Movva, N.R.; Thompson, C.; Van Montagu, M. und Leemans, J. (1987).
Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme.
EMBO J. **6**, 2513-2518.
- Diersch, H. (1986)
Einfluß des Immunsuppressivums Ovalicin auf den Stoffwechsel ribosomaler RNA in S49.1 Lymphomzellen
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmacie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Dziadek, M.; Richter, H.; Schachner, M. und Timpl, R. (1983)
Monoclonal antibodies used as probes for the structural organization of the central region of fibronectin.
FEBS Lett. **155**, 321-325.
- Efstradiatis, A.; Kafatos, F. C.; Maxam, A. M.; und Maniatis, T. (1976)
Enzymatic *in vitro* Synthesis of Globin Genes.
Cell **7**, 279-288.
- Endo, T. und Watanabe, I. (1989)
Nitrilehydratase of *Rhodococcus* sp. N-774- Purification and amino acid sequences.
FEBS Lett. **243**, 61-64.
- Engvall, E. (1980)
Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT
Methods Enzymol. **70**, 419-454.
- Ernst, D. (1967)
Die Umsetzung des Cyanamids in Kulturböden
Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **116**, 34-44
- Estermaier, L. (1988)
Isolierung und Charakterisierung der Cyanamidhydratase (EC 4.2.1.69) aus *Myrothecium verrucaria*.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmacie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Gibson, W. (1981)
Protease-facilitated transfer of high molecular weight proteins during electrotransfer to nitrocellulose.
Anal. Biochem. **118**, 1-3.

- Gough, N. M. und Adams, J. M. (1978)
Immunoprecipitation of specific polysomes using *Staphylococcus aureus* protein A. Purification of the immunoglobulin k chain messenger RNA from mouse myeloma MPC11.
Biochemistry **17**, 5560-5566.
- Gubler, U. und Hoffmann, B. J. (1983)
A simple and very efficient method for generating cDNA libraries
Gene **25**, 263-269.
- Hanahan, D. (1983)
Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids.
J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Harper, D. B. (1977)
Microbial Metabolism of Aromatic Nitriles.
Biochem. J. **165**, 309-319.
- Hawkes, R.; Niday, E. und Gordon, J. (1982)
A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies.
Anal. Biochem. **119**, 142-147.
- Hohn, B. (1979)
In vitro packaging of Lambda and Cosmid DNA.
Methods Enzymol. **68**, 299-309.
- Huiet, L. und Case, M. (1985)
Molecular Biology of the qa Gene cluster of *Neurospora crassa*. in: Gene Manipulations in Fungi, S. 229-244
ed. Bennett J. W. und Lasure L.L., Academic Press
- Hurn, B. A. L. und Chantler, S. M. (1980)
Production of Reagent Antibodies.
Methods Enzymol. **70**, 104-142.
- Huynh, T. V.; Young, R. A. und Davis, R. W. (1985)
Constructing and Screening cDNA Libraries in Lambda-gt10 and Lambda-gt11.
in: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol.I
(Glover, D. M. ed.) 49-78, IRL, Oxford.

- Jaenicke, L. (1966)
Einführung in die Praxis des Biochemikers
als Manuskript gedruckt, Köln Institut für Biochemie
- Kamiryo, T. und Okazaki, K. (1984)
High-Level Expression and Molecular Cloning of Genes
Encoding *Candida tropicalis* Peroxisomal Proteins.
Mol. Cell. Biology **4**, 2136-2141.
- Kaufmann, S. H.; Ewing, C. M. und Shaper, J. H. (1987)
The Eraseable Western Blot.
Anal. Biochem. **161**, 89-95.
- Kingston, R. E. (1987)
Preparation of Poly(A)RNA.(4.9.1.) in Current Protocols in
Molecular Biology 1987-1988, ed. F. M. Ausubel, R. Brent,
R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith
K. Struhl, Harvard Medical School, Boston MA., USA
- Klickstein L. B. (1987)
Production of a cDNA Library. (5.8.1.) in Current Protocols
in Molecular Biology 1987-1988, ed. s. o.
- Kraus, J. P. und Rosenberg, L. E. (1982)
Purification of low-abundance messenger RNAs from rat
liver by polysome immunadsorption.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4015-4019.
- Lämmlí, U. K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the
Head of Bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.
- Lehman, I. R. (1981)
in The Enzymes: Nucleic Acids (Teil A) XIV, (P. D. Boyer, ed.)
Academic Press, New York, 15-37.
- Lehrbach, H.; Diamond, D.; Wozney, J. M. und Boedtker H.
(1977)
RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis
under denaturing conditions: a critical reexamination.
Biochemistry **16**, 4743-4748.
- Little, R. und Anderson, P. (1987)
Structural Properties of Cyanase.
J. Biol. Chem. **262**, 10120-10126.

- Locker, J. (1979)
Analytical and Preparative Electrophoresis of RNA in
Agarose-Urea.
Anal. Biochem. **98**, 358-367.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. und Randall R. J.
(1951)
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- Mage, M. (1980)
Preparation of Fab Fragments from IgGs of Different
Animal Species.
Methods Enzymol. **70**, 142-150.
- Maier, U. (1989)
Cyanamidhydratase: Analyse des Proteins und seines Gens.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmacie der Ludwig-
Maximilians-Universität, München. (in Vorbereitung)
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical
cleavages.
Methods Enzymol. **65**, 499-560.
- McGookin, R. (1984)
Messenger RNA Fractionation on Neutral Sucrose Gradients
S. 121-124, in: *Methods in Molecular Biology* (Walker, J.M.
ed.) Vol II, Humana Press, Clifton, N. J.
- McMaster, G. K. und Carmichael, G. G. (1977)
Analysis of single and double-stranded nucleic acids on
polyacrylamid and agarose gels by using glyoxal and
acridine orange.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4835-4841.
- Michel, R. E.; Wachter E. und Sebald W. (1979)
Synthesis of a larger precursor for the proteolipid subunit
of the mitochondrial ATPase complex of *Neurospora crassa* in a
cell-free wheat germ system.
FEBS Lett. **101**, 373-376.

- Murphy, R. F.; Imam, A.; Hughes, A. E.; McGucken, M. J.; Buchanan, K. D.; Colon, J. M. und Elmore, D. T. (1976)
Avoidance of strongly chaotropic eluents for immunoaffinity chromatography by chemical modification of immobilized ligand.
Biochim. Biophys. Acta **420**, 87-96.
- Nagasawa, T.; Ryono, K. und Yamada, H. (1986)
Nitril-Hydratase from *Brevibacterium R312*-Purification and Characterization.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **139**, 1305-1312.
- Nagasawa, T.; Nanba, H.; Ryono, K.; Takeuchi, K. und Yamada, H. (1987)
Nitril-Hydratase of *Pseudomonas chlororapis B23*.
Eur. J. Biochem. **162**, 691-698.
- Obermaier, B. (1984)
Isolierung und Charakterisierung der Cyanamidhydratase (EC 4.2.1.69) aus *Myrothecium verrucaria*.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmacie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Okayama, H. und Berg, P. (1982)
High-Efficiency Cloning of Full-Length cDNA
Molecular and Cellular Biology **2**, 161-170.
- Ouchterlony, O. (1958)
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Prog. Allergy **5**, 1-78
- Pelham, H. R. B. und Jackson, R. J. (1976)
An efficient mRNA-dependant translation for reticulocyte lysat.
Eur. J. Biochem **67**, 247-256.
- Pharmacia (1986)
Affinity Chromatographie: principles and methods
Laboratory Separation Division, Uppsala, Schweden.
- Rauen, H. M. (1956)
Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, 650-653.
- Rathsack, K. (1955)
Über Zersetzungsprodukte des Cyanamids im Boden.
Landwirtschaftl. Forschung, **6**. Sonderheft, 116-123.

- Reinert, W. R. und Giles, N. H. (1977)
 Proof of *de novo* synthesis of the enzymes of *Neurospora crassa* during induction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4256-4260.
- Reinert, W. R.; Patel, V. B. und Giles, N. H. (1981)
 Genetic regulation of the *qa* Gene cluster in *Neurospora crassa*, Induction of *qa* mRNA and dependency on *qa-1* function.
Mol. Cell. Biol. **1**, 829-835.
- Renart, J.; Reiser, J. und Stark, G. R. (1979)
 Transfer of proteins from gels to DMB paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3116-3120.
- Schleif, R. F. und Wensink, P. C. (1981)
 Practical Methods in Molecular Biology,
 Springer Verlag New York Inc.; New York.
- Selden, R. F. (1987)
 Analysis of RNA by Northern Hybridisation (4.9.1.)
 in Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988
 Harvard Medical School, Boston USA
- Skrobranek, B. (1988)
 Gen und Genprodukt für eine *rpoB* unabhängige
 Rifampicinresistenz in *E.coli*..
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der
 Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- SKW Trostberg (1981)
 Alzodef-Produktstudie, Technische Information 9/81.
- Slater, R. J. (1984)
 in Mth. in Mol. Biol. (Walker, J. M., ed.) Vol II,
 Humana Press, Clifton, N. J. 101-108, 107-120.
- Smith, A. E. und Cullimore, D. R. (1974)
 The *in vitro* degradation of the herbicide bromoxynil.
Can. J. Microbiol. **20**, 773.

- Snyder, M.; Elledge, S.; Sweetser, D.; Young, R. A. und Davis, R. W. (1987)
 Lambda-gt11: Gene Isolation with Antibody Probes and other Applications.
Methods Enzymol. **154**, 107-128.
- Sorge, J.; West, C.; Westwood, B. und Beutler E. (1985)
 Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7289-7293.
- Southern, E. (1975)
 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
- Spiegelberg, H. L. (1974)
 Biological activities of immunoglobines of different classes and subclasses.
Adv. Immunol. **19**, 259-294.
- Stalker, D. M.; Malyj, L. D. und McBride, K. E. (1988a)
 Purification and Properties of a Nitrilase Specific for the Herbicide Bromoxynil and Corresponding Nucleotide Sequence Analysis of the bxn Gene.
J. Biol. Chem. **263**, 6310-6314.
- Stalker, D. M.; McBride, K. E.; und Malyj, L. D. (1988b)
 Herbicide Resistance in Transgenic Plants Expressing a Bacterial Detoxification Gene.
Science **242**, 419-422.
- Stransky, H. und Amberger, A. (1973)
 Isolierung einer Cyanamidhydratase (E. C.-Gruppe 4.2.1.) aus *Myrothecium verrucaria* Alb. und Schw.
Z. Pflanzenphysiol. **70**, 74-78.
- Thomas, P. (1980)
 Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5201-5205.
- Thompson, C. J.; Movva, N. R.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J. E.; Lauwereys, M. und Botterman, J. (1987)
 Charakterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*.
EMBO **6**, 2519-2523.

- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid
gels to nitrocellulose sheets: procedure and some
applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982)
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion
mutagenesis and sequencing with synthetic universal
primers.
Gene **19**, 259-268.
- Vilsmeier, K. (1982)
Verbesserte kolorimetrische Bestimmung von Dicyandiamid
in Bodenextrakten.
Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. **145**, 503-505.
- Warburg, O. und Christian, W. (1941)
Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.
Biochem. Z. **310**, 265-275.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969)
The reliability of molecular weight determination by dodecyl-
sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. **244**, 4406-4412.
- Weiß, W. (1989)
Termination der Transkription von T7 RNA Polymerase.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Werner, D.; Chemula, Y. und Herzberg, M. (1984)
Isolation of Poly(A) mRNA by Paper Affinity Chromatography.
Anal. Biochem. **141**, 329-336.
- Williams, J. G. (1981)
in Genetic Engineering: 1 (R. Williamson, ed.)
Academic Press, London, 1-59.
- Winnacker, E.-L. (1984)
Gene und Klone. Einführung in die Gentechnologie.
Verlag Chemie, Weinheim.

Winberg, G. und Hammarskjöld, M. C. (1980)

Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper.

Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA.

Nucleic Acids Res. **8**, 253-264.

Young, R. A. und Davis, R. W. (1983a)

Efficient isolation of genes by using antibody probes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 1194-1198.

Young, R. A. und Davis, R. W. (1983b)

Yeast RNA PolymeraseII Genes: Isolation with Antibody Probes.

Science **222**, 778-782.

LEBENS LAUF

Name: Brigitte Obermaier-Skrobranek
geboren: 14. 9. 1959
Geburtsort: München
Eltern: Friedrich und Margarete Obermaier geb. David
Polizeibeamter / Hausfrau
Familienstand: verheiratet seit dem 10. 5. 1985 mit dem
Dipl.-Chemiker Dr. Bernhard Skrobranek

Ausbildung

Sept. 1965 - Juli 1969 Grundschule an der Dachauer Str., München
Sept. 1969 - Juli 1978 Sophie-Scholl-Gymnasium
(sozialwissenschaftlich), München
Juni 1978 Abitur
Nov. 1978 - Dez. 1984 Studium der Chemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1981 Vordiplom
Nov. 1983 Diplomhauptprüfung
Jan. 1984 - Dez. 1984 Diplomarbeit am Institut für Biochemie
der Ludwig-Maximilians-Universität,
München unter Anleitung von
Prof. Dr. G. R. Hartmann
ab Jan. 1985 Doktorarbeit am selben Institut unter
Anleitung von Prof. Dr. G. R. Hartmann

ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K/L-Puffer	Kinase/Ligase-Puffer (S. 60)
NET-Puffer	NaCl-EDTA-Tris Puffer (S. 43)
NTE-Puffer	NaCl-Tris-EDTA Puffer (S. 58)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PBS-Puffer	Phosphat-NaCl Puffer (S. 24)
PER	Ammoniumperoxodisulfat
pfu	Plaque forming units
SM-Puffer	NaCl-MgSO ₄ -Tris Puffer (S. 42)
SSC-Puffer	NaCl-Na-citrat Puffer (S. 47)
SSPE-Puffer	NaCl-Phosphat-EDTA-Puffer (S. 48)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer (S. 64)
TBS	Tris-NaCl Puffer (S. 36)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfB I und II	Transformationspuffer I und II
TPNS	Triisopropylnaphtalinsulfonat
TYM-Medium	Trypton-Yeast-Medium (S. 7)
U	Aktivitätseinheit (Definition je nach Hersteller unterschiedlich)
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactosid

